

Über Kollagen und Kollagenase

von

ARNOLD NORDWIG

=

1961

Über Kollagen und Kollagenase

Inaugural - Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Naturwissenschaftlichen Fakultät
der
Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von

Arnold Nordwig

am

17. Februar 1961



1. Berichterstatter: Prof. Dr. W. Graßmann

2. Berichterstatter: Prof. Dr. F. Lynen

Tag der mündlichen Prüfung: 10. Mai 1961

MEINEM LIEBEN VATER

Herrn Prof. Dr. W. Graßmann,

meinem verehrten Lehrer, bin ich für Themastellung,
häufige Diskussionen zu den Problemen dieser Arbeit
und finanzielle Unterstützung zu großem Dank ver-
pflichtet.

Ebenfalls herzlich gedankt sei für seine Anregungen

Herrn Dr. H. Hörmann,

dessen große Erfahrung auf dem Kollagengebiet eine
wertvolle Hilfe für mich bedeutete.

Inhaltsübersicht

A. Einleitung

	Seite
I. Allgemeines über Kollagen und Kollagenase	1
II. Aufgabenstellung	8

B. Ergebnisse

I. Methodischer Teil: Verbesserung der quantitativen Kollagenase-Bestimmung	
1. Heterogener Suspensions-Test	9
2. Kolorimetrische Methode	14
II. Untersuchungen zur Spezifität der Kollagenase	
1. Synthetische Peptide	18
2. Natürlich vorkommendes Material	23
a) Prokollagen	23
b) Enzymatisch angereicherte Neutralbereiche von Prokollagen	33
c) Neutralpeptid $N_{VI/V}$	35
3. Partielle Zerstörung der Neutralbereiche des Kollagens durch Kollagenase	38
a) Elektronenmikroskopische Versuche	39
b) Partielle Chromgerbung, Kollagenaseabbau und nachfolgende Aminosäureanalyse	41
III. Untersuchungen zur Bedeutung der Neutralzucker im Kollagen	46
1. Totalabbau von Rinderhaut-Kollagen mit Kollagenase	47
2. Partielle Chromgerbung und nachfolgender Kollagenaseabbau	49
3. Partielle Denaturierung und nachfolgender Trypsinabbau	51

C. <u>Diskussion der Ergebnisse</u>	Seite
I. Die heute gültige Vorstellung von der Kollagenase-Spezifität	56
II. Bedeutung der Abbau-Ergebnisse für die Primärstruktur des Kollagens	61
III. Neutralzucker und Quervernetzungen im reifen Kollagen	69
D. <u>Experimenteller Teil</u>	72
E. <u>Zusammenfassung</u>	88
F. <u>Literatur</u>	90

A. Einleitung

I. Allgemeines über Kollagen und Kollagenase

1. Kollagen

Das Faserprotein Kollagen, nach Vorkommen und Funktion ein sehr wichtiger Bestandteil des Bindegewebes beim Säuger, gehört zu den am besten untersuchten Proteinmakromolekülen. Das hat eine Reihe von Gründen: Neben seinen chemischen und physikalischen Strukturbesonderheiten interessiert es wegen der Beteiligung an wichtigen physiologischen Vorgängen im Organismus; z.B. ist die Frage der Wundheilung und -vernarbung eng mit dem Kollagen verknüpft. Auch die Lösung einiger technischer Probleme - etwa die Gerbung der Haut zu Leder oder die Verkochnung zu Gelatine - führt über das Kollagen.

Chemische Eigenschaften

Dem Chemiker fällt zunächst als Besonderheit der hohe Prozentsatz an L-Prolin (ca. 13-14 Mol pro 100 Mol Aminosäuren) und L-Hydroxyprolin (ca. 8,5 Mol pro 100 Mol Aminosäuren) auf. Letzteres ist als Bestandteil von Eiweißkörpern sonst unbekannt. Das gleichfalls sehr seltene Hydroxylysin, das im Kollagen allerdings nur einen Anteil von etwa 0,5 Mol% ausmacht¹⁾, soll neuerdings auch in den α - und γ -Fraktionen des Serumglobulins gefunden worden sein²⁾. Ferner ist für das Kollagen charakteristisch, daß es im nativen Zustand von Proteasen wie Trypsin, Chymotrypsin, Elastase u.a. gar nicht³⁾, in denaturiertem Zustand dagegen sehr leicht verdaut werden kann⁴⁾. Eine Ausnahme bildet allein die bakterielle Kollagenase, die in dieser Arbeit behandelt werden soll.

Strukturmodell

Die derzeit am meisten diskutierte Modellvorstellung von Rich und Crick⁵⁾ sagt aus, daß Kollagen aus drei

einander zugeordneten, links gedrehten Peptidspiralen besteht, die untereinander quer zur Faserrichtung durch Wasserstoffbrücken verbunden sind. Die Primärstruktur der Peptidketten besteht dabei aus einer regelmäßigen Folge $\text{-Gly-R}_1\text{-R}_2\text{-}$, in der R_1 jede Aminosäure vorstellen kann, R_2 jede Aminosäure mit Ausnahme von Valin und Isoleucin. Die Iminosäuren Prolin und Hydroxyprolin haben dabei für die Struktur insofern große Bedeutung, als in ihren Pyrrolidinringen die freie Drehbarkeit zwischen den N- und α -C-Atomen aufgehoben ist, was eine starre Struktur bedingt. Während das Glycin nach den Vorstellungen von R i c h und C r i c k im Inneren der Dreierspirale angeordnet sein soll, sind die Prolin- und Hydroxyprolinreste außen eingebaut, und zwar so, daß eine Wasserstoffbrücke zwischen der Hydroxylgruppe des Hydroxyprolins der einen Kette zum Peptidsauerstoff der benachbarten Kette ermöglicht wird. Die Ergebnisse von G u s t a v s o n ⁶⁾, der einen Zusammenhang zwischen dem Gehalt an Hydroxyprolin und der Schrumpfungstemperatur bei verschiedenen Kollagenen beobachtete, sind hierfür eine starke Stütze. Nicht sicher dagegen ist, ob die drei Peptidspiralen in ihrer Primärstruktur identisch sind; tatsächlich sprechen Befunde von D o t y und N i s h i h a r a ⁷⁾ dafür, daß sie sowohl hinsichtlich ihrer Aminosäuresequenz als auch in ihrer Kettenlänge unterschiedlich sein können. Die Überstruktur der Kollagenfaser schließlich kommt dadurch zustande, daß sich die drei Peptidspiralen ihrerseits zu einer geordneten, rechtsgewundenen Spirale verdrillen.

Geordnete und ungeordnete Bereiche

Die geordnete Struktur gilt aber nicht für die ganze Faser. Das ging schon eindeutig aus den Versuchen von R a n d a l l ⁸⁾ hervor, der beim Dehnen der Kollagenfaser die Weitwinkelinterferenzen unverändert fand (bezogen auf die Gesamtdehnung), dagegen eine Aufweitung der Kleinwinkelabstände beobachtete. Das bedeutet, daß in der Faser nichtkristalline Bereiche vorliegen, die sich beim Dehnen strecken, während die kristallinen Bereiche weitgehend unverändert bleiben.

Ebenfalls stark beweisend für eine diskontinuierliche Struktur

der Kollagenfibrille sind die elektronenmikroskopischen Ergebnisse. Schon 1942/43 fanden unabhängig voneinander S c h m i t t und seine Schule⁹⁾ sowie W o l p e r s¹⁰⁾ ein Querstreifungsmuster mit einer Periode von etwa 640 Å. Nach dem Krieg konnte in unserem Arbeitskreis diese Periode in 13 Querstreifen aufgelöst werden¹¹⁾. Die zuerst von B e a r¹²⁾ ausgesprochene und vor allem durch Arbeiten von G r a ß m a n n , H a n n i g et al.¹³⁾ und K ü h n¹⁴⁾ gesicherte Erklärung für diese Querstreifung der Faser besagt, daß die Hellteile des Musters Anhäufungen von kleinen, der Einordnung in eine Struktur leicht zugänglichen und auch "optisch leichten" Aminosäuren, wie Glycin, Prolin und Hydroxyprolin zuzuordnen sind, während die dunklen Banden auf das Überwiegen von polaren, sperrigen Gruppierungen zurückzuführen sein sollen. K ü h n , G r a ß m a n n und H o f m a n n hatten durch systematische Veränderung der freien basischen und sauren Seitenketten der Kollagenfaser¹⁵⁾ gezeigt, daß die Kontrastverschärfung der Querstreifung, die bei Einlagerung von Phosphorwolframsäure oder Chromsalzen in die Faser zustandekommt, tatsächlich auf Anhäufungen von Basen (besonders Arginin), bzw. von sauren Aminosäuren (Glutaminsäure und Asparaginsäure) in bestimmten Bereichen der Fibrille zustandekommt. Durch vergleichende Photometrierung der erhaltenen elektronenmikroskopischen Aufnahmen gelang es auch erstmals, diese Anhäufungen im Faserbild zu lokalisieren.

Man darf also heute annehmen, daß das von R i c h und C r i c k entwickelte Modell nicht streng für die ganze Kollagenfaser gilt; vielmehr weiß man, daß Bereiche mit einem hohen Grad an dieser kristallinen Ordnung abwechseln mit Strukturelementen, die weniger stark geordnet sind, denen aber wahrscheinlich von den jeweils benachbarten kristallinen Bezirken ein gewisser Grad an Ordnung aufgezwungen wird.

Vorstufen der Kollagenfaser

In der Hauptsache F.O. S c h m i t t und seinen Mitarbeitern verdanken wir eine gründliche Erforschung der Vorgänge, die zur Bildung der reifen Kollagenfaser führen, und die sich, kurz zusammengefaßt, heute etwa so darstellen: Das Monomere des Kollagens ist das in der Gewebsflüssigkeit gelöste Tropokollagen,

das man mit verdünnten Kochsalz- oder Neutralpuffer-Lösungen aus Kollagenmaterialien extrahieren kann¹⁶⁾. Aus diesen Lösungen scheiden sich bei längerem Stehen Fasern ab, die die charakteristischen Querstreifen der Kollagenfibrille mit einer Periode von 640 Å zeigen und als Prokollagen bezeichnet werden. Prokollagen ist ein auch aus der Haut junger Rinder in großen Anteilen darstellbares Material^{17), 18)}, das sich vom reifen Kollagen lediglich durch seine Löslichkeit in schwacher Essigsäure bzw. in Citratpuffer vom pH 3,8 unterscheidet, sowie dadurch, daß es durch wasserstoffbrückensprengende Reagenzien (Lithiumjodid, Harnstoff, Phenol u.a.) in Lösung gebracht werden kann¹⁹⁾. Man muß also annehmen, daß bei der Reifung der Faser - also beim Übergang Prokollagen-Kollagen - zusätzliche Quervernetzungen eine Verfestigung der Struktur mit sich bringen. Auf die Frage dieser Quervernetzungen wird an einer anderen Stelle dieser Dissertation ausführlicher eingegangen (siehe Kapitel C, III).

Aus Kollagenlösungen kann man aber auch durch bestimmte Zusätze künstliche Formen von Kollagen erhalten, die im Elektronenmikroskop unterschieden werden können. So fallen in Gegenwart von Nukleinsäuren oder von ATP Faserteilchen mit einer Länge von 2800 Å und hochunterteilter Querstreifung an, die als SLS-Kollagen bezeichnet werden ("segmented long spacing collagen")²⁰⁾. Ihr Auftreten kann man durch eine vom Normalfall unterschiedliche Zusammenlagerung der polaren Tropokollagen-Grundeinheiten gut erklären²¹⁾. Während sich nämlich bei der normalen Faserbildung die 2800 Å langen Tropokollagenmoleküle parallel, aber um ein Viertel ihrer Länge versetzt zusammenlagern²²⁾, was durch die chemischen Untersuchungen von Kühn^{14,23} in Zusammenhang mit elektronenmikroskopischen Aufnahmen endgültig bewiesen werden konnte, lagern sie sich bei Anwesenheit von Nukleotiden in gleicher Richtung mit den Enden abschneidend nebeneinander. Das Querstreifungsmuster des Tropokollagens bleibt also beim SLS-Kollagen erhalten und wird unverfälscht und besonders deutlich wiedergegeben. Diese Kenntnis der genauen Struktur des Kollagenmonomeren ist heute ein besonders wertvolles Hilfsmittel für die Kollagenforschung.

Die Kohlenhydratkomponente des Kollagens

Prokollagen läßt sich durch Auflösen in schwach sauren Medien und anschließendes Dialysieren beliebig oft umkristallisieren. Das erlaubt naturgemäß eine weit bessere Reinigung des hochmolekularen Materials als beim unlöslichen reifen Kollagen. Um so mehr überraschte es, als man auch in diesem hochgereinigten Eiweiß die gleiche Menge Hexosen, nämlich ca. 0,5 Gew.% fand^{15c, 24)}, die schon früher im Kollagen nachgewiesen worden war²⁵⁾. Den Hauptanteil des vorhandenen Zuckers bestreiten Glucose und Galactose neben wenig Mannose und Fucose.

Außerdem ist in Kollagen, das mit Trypsin und durch anschließende kurze Kalkbehandlung von Fremdproteinen befreit worden war, ein Anteil von 0,2 - 0,5 % Hexosaminen, hauptsächlich Glucosamin vorhanden. Durch Äschern kann man diese Aminosucker praktisch vollständig, durch Behandeln mit Hyaluronidase etwa zur Hälfte entfernen²⁶⁾. Auch in rohem Prokollagen finden sich geringe Mengen von Aminosuckern. Sie lassen sich durch häufiges Umkristallisieren^{24a)} oder Behandeln der Prokollagenlösung nach S e v a g²⁷⁾ abtrennen. In allen diesen Fällen werden die Hexosen nur teilweise entfernt. Es hinterbleibt stets ein Rest von etwa 0,5 Gew.%, der fest mit der Faser verbunden ist. Elektronenmikroskopisch kann bei diesen Reinigungsoperationen zwar eine Abnahme der Dicke der Fasern, aber kein Verschwinden ihrer Querstreifung festgestellt werden^{15c, 28)}. Das widerlegt die Ansicht russischer Autoren²⁹⁾, die eine periodische Ablagerung von Kohlenhydraten auf der Faser für die Querstreifung der Fibrillen verantwortlich machen wollen.

Die Hexosamine scheinen nach diesen Ergebnissen also nicht strukturgebunden und damit keine wirkliche Komponente der Faser zu sein. In jüngster Zeit wurde allerdings in unserem Institut^{30, 31)} unter den tryptischen Spaltprodukten des Prokollagens ein Peptid gefunden, das Glucosamin enthält. Über seine Bedeutung kann gegenwärtig noch nichts ausgesagt werden, jedoch beträgt die Menge des Aminosuckers nur etwa 0,1 % vom Gesamtprotein.

Die Neutralzucker sind im Gegensatz zu den Hexosaminen sehr viel fester gebunden. Man kann sie erst mit chemischen Abbau- methoden aus dem Fasergefüge entfernen. Schon nach kurzer Ein- wirkung zerstört NaJO_4 den Hexosenanteil weitgehend³²⁾. Die Aminosäurezusammensetzung des Kollagens bleibt dabei im we- sentlichen unverändert³³⁾, auch die elektronenmikroskopische Querstreifung ist noch vorhanden^{15c)}. Auch von dieser Seite her wird also die Annahme von M i k h a i l o v u.a.²⁹⁾ wider- legt. Welche Rolle spielen die Neutralzucker-Gruppierungen aber dann wirklich beim Aufbau der Faser?

Auf diese Frage werde ich in einem späteren Abschnitt der Dis- sertation noch einmal eingehender zurückkommen müssen.

2. Kollagenase

Wie weiter oben schon erwähnt, ist natives Kollagen proteo- lytisch im allgemeinen nicht angreifbar. Zwar verdauen Pepsin und Cathepsine³⁴⁾ kollagenes Material im nativen Zustand, aber ihr pH-Optimum liegt schon so weit im saueren Bereich, daß unter diesen Bedingungen zumindest eine starke Quellung eintritt, die den Angriff des Enzyms erleichtert. Alle enzymatischen Unter- suchungen an Kollagen, z.B. mit Trypsin, mußten sich also mit denaturiertem Eiweiß begnügen. Dieser Umstand erklärt die in- tensive Suche nach Kollagenase, einem Ferment, das natives Kol- lagen bei annähernd physiologischen Bedingungen angreift.

Mit Sicherheit ist ein solches Enzym bisher nur in den Kultur- filtraten von Anaerobiern nachgewiesen worden. Zwar sollen in den Larven einiger Fliegenfamilien³⁵⁾, in Autolysaten von Wan- derlarven³⁶⁾ und in Eingeweidewürmern³⁷⁾ kollagenverdauende Aktivitäten gefunden worden sein. Doch wurde in einigen Fällen entweder kein natives Substrat angeboten oder die Anwesenheit von Bakterien nicht exakt genug ausgeschlossen; auch die übr- igen Befunde sind enzymchemisch wenig genau untersucht worden. Orientierende eigene Versuche mit Larven der Schmeißfliege *Calliphora erythrocephala* blieben gleichfalls erfolglos.

Immerhin erscheint die Existenz einer Insektenkollagenase nicht unmöglich, insbesondere im Hinblick auf die Hautschädigungen an Rindern durch Dasseliegenlarven. Auch die neuen Ergebnisse von W o e s s n e r jr.³⁸⁾ über Kollagenase im Uterus haben aus medizinischer Sicht gesehen viel für sich.

Das Verdienst der Entdeckung der bakteriellen Kollagenase gebührt M a s c h m a n n , der 1937 in den Kulturfiltraten einiger Gasbranderreger, darunter der Clostridien-Stämme Cl. welchii, Cl. perfringens und Cl. histolyticum kollagenverdauende Aktivitäten nachweisen konnte³⁹⁾. Die genauesten Untersuchungen darüber stammen aber von Ines M a n d l und ihrem Arbeitskreis. Sie untersuchte 162 Stämme von Mikroorganismen und bestätigte, daß nur die Clostridienarten Kollagenase produzieren können; die mit Abstand aktivste war die von Clostridium histolyticum⁴⁰⁾. Das stimmte mit den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen überein⁴¹⁾, ebenso der Befund, daß das Enzym ausschließlich die verschiedenen Kollagene und deren Gelatinen verdaut^{42,43)}. Den gleichen Bearbeitern gelang eine Reinigung des Enzyms durch Ammonsulfat-Fraktionierung⁴³⁾. Mit dem gereinigten Enzym ließ sich zunächst als wichtigste Frage die der mucolytischen⁴⁴⁾ oder proteolytischen Wirksamkeit des Ferments eindeutig zugunsten der letzteren entscheiden⁴⁵⁾.

In der Folgezeit befaßten sich besonders die beiden amerikanischen Forschergruppen um M a n d l und G a l l o p mit dem neu entdeckten Enzym. M a n d l fand den isoelektrischen Punkt zu pH 9,6 und ein breites Aktivitätsoptimum zwischen 6,2 bis 9,6 in verschiedenen Puffersystemen⁴⁶⁾. G a l l o p und Mitarb.^{47,48)} konnten das Enzym durch Stärkeelektrophorese und Absorption an Aluminiumoxyd-Gel C₁₈ weiter reinigen, arbeiteten als erste einen quantitativen Test aus und fanden eine Aktivierbarkeit durch Calciumionen. Aus der Hemmbarkeit der Kollagenase durch Sulfhydrylverbindungen wurde auf ein zweites aktivieren-des Metall geschlossen. Von den Proteasen aus Pankreas unterscheidet sich die Kollagenase charakteristisch dadurch, daß sie mit Diisopropylfluorophosphat (DFP) nicht gehemmt werden kann; sicher ist sie also kein Enzym, in dem ein mit DFP reagierendes Serin dem aktiven Zentrum angehört.

II. Aufgabenstellung

Ziel der vorliegenden Dissertation war, einige der im einleitenden Abschnitt als offen geschilderten Fragen näher zu untersuchen.

Die stark ausgeprägte Spezifität der Kollagenase - nur Kollagen und Gelatine, keine anderen Eiweißkörper werden verdaut - ließ einen Zusammenhang mit den Besonderheiten im Molekülaufbau des Kollagens vermuten. Bei der Suche nach der genauen Substratspezifität war das Augenmerk besonders auf den auffallend hohen Gehalt des Kollagens an Prolin und Hydroxyprolin zu richten.

Diese Iminosäuren sollten andererseits neben Glycin eine wichtige Rolle beim Aufbau der Hellteile der Faser ("interbands") spielen, die ja nach dem eingangs Gesagten mit Anhäufungen neutraler Bausteine identisch sind. Im Sinne des Modells von Rich und Crick handelt es sich sogar um periodisch oder doch wenigstens nach festen Regeln gebaute Anhäufungen. Enzymatische Spaltung von Kollagen mit Kollagenase und nachfolgende Untersuchung der entstandenen Peptidbruchstücke bot deshalb gute Aussichten, einen Einblick in den Bau der Interbands zu erhalten. Zusätzlich sollte sich so auch die Spaltungsweise der Kollagenase an ihrem natürlichen Substrat studieren lassen.

Außerdem bedurfte die Frage nach der Bedeutung der fest gebundenen Neutralzucker im Kollagen einer weiteren Bearbeitung. Da der Kohlenhydrat-Gehalt mit etwa 0,5 Gew.% sehr gering ist, sollte eine enzymatische Anreicherung durch partielle proteolytische Verdauung versucht werden, um genauere Untersuchungen zu ermöglichen.

Ferner erschien für Arbeiten mit Kollagenase die Ausarbeitung eines exakten quantitativen Enzymtestes wünschenswert.

B. E r g e b n i s s e

I. Methodischer Teil: Verbesserung der quantitativen Kollagenase-Bestimmung

1. Heterogener Suspensionstest

Erst G a l l o p hat 1957 einen quantitativen Test für Kollagenase-Untersuchungen eingeführt⁴⁷⁾. Weil damals die Spezifität des Enzyms noch völlig unbekannt war und synthetische Präparate deshalb keine Verwendung finden konnten, mußte er im heterogenen System arbeiten und standardisierte Kollagensuspensionen einsetzen.

Nach seiner Vorschrift inkubiert man Ichthyocol (Karpfenschwimmblasen-Kollagen) in Trispuffer mit dem Enzym. Nach Abstoppen der Reaktion mit Alkohol und Filtrieren wird in einem aliquoten Anteil die gelöste Menge Protein nach der Anfärbemethode von L o w r y⁴⁹⁾ bestimmt. Als eine Kollagenase-Einheit wurde diejenige Enzymmenge definiert, die unter den Versuchsbedingungen 1 mg der eingesetzten 8 mg Ichthyocol löst. Aus kinetischen Gründen hat der Test aber nur Gültigkeit, wenn 4 mg Ichthyocol oder weniger verdaut werden.

In einer zweiten Methode wird die Abnahme der spezifischen Viskosität einer Lösung von Ichthyocol in Calciumchlorid bei Kollagenase-Einwirkung gemessen. Durch Verwendung von Enzymmengen, die nach oben beschriebener Methode getestet wurden, kann man eichen und so auf die definierte Einheit der Kollagenase rückbeziehen.

Nun ist aber das hier verwendete Fischschwimmblasen-Kollagen von den von uns untersuchten Rinderkollagenen nach Zusammensetzung und physikalischen Eigenschaften sicher verschieden^{6,50)}. Ichthyocol geht schon bei Körpertemperatur langsam in Gelatine über und erscheint allein deshalb wenig geeignet für Bestimmungen bei 37°. Außerdem aber weiß man, daß die Anfärbemethode von

L o w r y neben einer Biuretreaktion mit alkalischem Cu^{++} auf einer Reduktion des Phosphormolybdat-Phosphorwolframat-Reagens durch vorhandenes Tyrosin, Tryptophan und Cystein beruht⁵¹⁾. Cystein und Tryptophan sind aber in Kollagenen überhaupt nicht vorhanden, Tyrosin nur in verschwindend geringer Menge. Da andererseits durch die Reaktion mit Kupfer verschieden lange Peptide in unterschiedlicher Farbtönung und mit wechselnder Intensität angefärbt werden, schien es angezeigt, den Test auf eine absolut verlässliche Basis zu stellen.

Ich wählte die Bestimmung des in Lösung gegangenen Stickstoffs nach einem Mikroverfahren⁵²⁾, mußte aber dabei ebenfalls alle Nachteile einer heterogenen Testreaktion in Kauf nehmen. Die von G a l l o p vorgeschlagenen Inkubationsbedingungen wurden beibehalten. Als Substrat wurde das in sehr reiner Form und reproduzierbar darstellbare Prokollagen in Form einer 0,4-%igen Suspension eingesetzt. Die so standardisierten Bedingungen sind als Versuch 1* zusammengefaßt.

Die Prokollagensuspensionen lassen sich erstaunlich genau pipettieren. Eine Versuchsreihe ergab durch Bestimmung des Kjeldahl-Stickstoffs, daß der mittlere Fehler dabei nur etwa 1 % ist. Leider ist diese Suspension nicht ganz trypsinfest - eine von G a l l o p nicht untersuchte Tatsache; man kann einen 5-10%igen Abbau durch Trypsin unter den Testbedingungen auch nach vorsichtigstem Homogenisieren nicht vermeiden (Apparat der Firma Bühler, Reutlingen). Die günstigsten Ergebnisse erhält man, wenn man als wäßrige Phase ebenso wie zur Außenkühlung Eiswasser verwendet und nur sehr kurz, etwa 30 Sek. homogenisiert.

* Versuche mit einer laufenden Nummer sind im Experimentellen Teil ausführlich geschildert.

Pufferzugabe erst vor der Inkubation ist einem Suspendieren in Pufferlösung deshalb vorzuziehen, weil in letzterem Falle unter den Inkubationsbedingungen kleine Blindwerte auftreten können (1-2 % Auflösung des eingesetzten Prokollagens in Puffer ohne Enzym). Das von mir verwendete Puffersystem war ein 0,2 molarer Phosphatpuffer vom pH 7,4, trotz der schon erwähnten Ca^{++} -Abhängigkeit des Enzyms, da stickstoffhaltige Puffer in diesem Test keine Verwendung finden können.

Es konnte gezeigt werden, daß der Abbau durch Kollagenase in Phosphatpuffer unter sonst gleichen Bedingungen nicht wesentlich geringer ist als der in Trispuffer mit und ohne Ca^{++} -Zusatz. Hierzu wurden Rinderkollagen und Kälberprokollagen in den verschiedenen Puffern mit Kollagenase inkubiert, der Rückstand zentrifugiert, gewaschen und nach Trocknen gewogen. Das Ergebnis zeigt Tab. I.

Tabelle I: Vergleich verschiedener Puffersysteme für den Abbau von Kollagen mit Kollagenase

(Die angegebenen Zahlen sind Mittelwerte aus jeweils drei identischen Ansätzen)

Kollagen: Einwaagen 10,0 mg; Inkubationsbedingungen: 60 min bei 37°; Rohenzym:Substrat = 1:10

Prokollagen: Einwaagen 20,0 mg; Inkubationsbedingungen: 20 min bei 37°; Rohenzym:Substrat = 1:20

	Phospat-Puff. 0,07m; pH=7,4	Tris-Puffer 0,07m; pH=7,4	Tris-Puffer + 0,005 m CaCl_2 0,075 m; pH=7,4
Verdauter Anteil des Kollagens (in %)	66,6	70	72,3
Verdauter Anteil des Prokollagens (in %)	61,3	56,3	62

Man sieht, daß der Zusatz von Calciumionen zum Tris-Puffer

keine signifikante Erhöhung der Abbauergebnisse mit sich bringt. Der Grund dafür mag darin zu suchen sein, daß das Substrat von der Herstellung her noch genügend Calciumionen enthält, jedenfalls so viel, wie der von G a l l o p vorgeschlagenen geringen Konzentration entspricht.

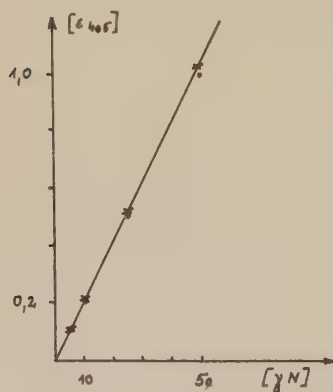


Abb. 1

Eichgerade für die Mikrostickstoffbestimmung nach Neßler-Winkler

Eichsubstanz: Ammonsulfat

x = unbehandelt

• = mit einstündigem Aufschluß

Ordinate: Extinktion bei 405 mμ

Abszisse: Mikrogramm Stickstoff

Als Eichsubstanz zur Stickstoffbestimmung wurde Ammonsulfat verwendet. Es zeigte sich, daß Linearität zwischen der Extinktion des Neßler-Farbstoffs und eingewogener Menge Ammonsulfat bis zu mindestens 50 γ Stickstoff besteht (Abb. 1). Somit war das Verfahren brauchbar für die Problemstellung; denn der für den Test interessierende Bereich liegt zwischen 0 und 27,2 γ Stickstoff (Stickstoffgeh. des Prokollagens: 17 Gew. %; Testmenge: 1/25 des gelösten Prokollagens, im Höchstfall von 4 mg).

Diese Testmethode mußte nun noch auf ihre praktische Brauchbarkeit im Enzymversuch geprüft werden. Dazu wurde die Konzentrations- und Zeitabhängigkeit der Einwirkung von Kollagenase auf Prokollagensuspension unter den Testbedingungen (Abb. 2) sowie das pH-Optimum in Phosphat-Puffer untersucht (Abb. 3).

Es zeigt sich, daß die Abbaureaktion bei niedrigen Enzymkonzentrationen bis zu einem etwa 50 %igen Abbau des Substrates linear,

Abb. 2

Konzentrations- und Zeitabhängigkeit des Kollagenaseabbaus von Prokollagen

Bedingungen:

Phosphatpuffer (0,04M, pH 7,4)
8 mg Prokollagen (als 0,4-%ige Suspension)

Enzym: 40 γ , 80 γ , 160 γ Rohkollagenase und 80 γ Trypsin

Inkubationsbedingungen: 10, 20, 30 und 60 min bei 37°

Ordinate: Extinktion bei 405 m μ

Abszisse: Zeit bzw. Enzymkonzentration

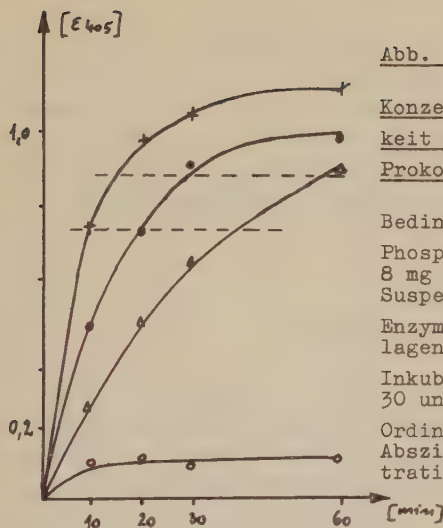


Abb. 3

pH-Optimum der Kollagenase in Phosphatpuffer

8 mg Prokollagen (als 0,4-%ige Suspension)

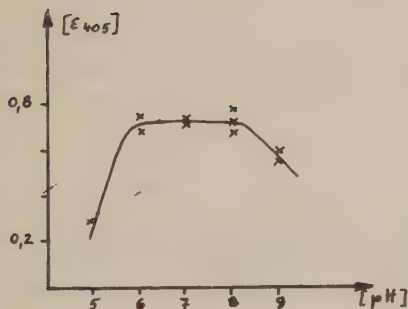
Pufferkonz. 0,04 m

Enzym:Substrat = 1:100

Inkubationsbedingungen: 20 min bei 37°

Ordinate: Extinktion bei 405 m μ

Abszisse: pH



d.h. nach nullter Ordnung verläuft. Dadurch wird die G a l - l o p' sche Angabe⁴⁷⁾ bestätigt, daß der Test nur Gültigkeit hat, wenn höchstens 4 mg der eingesetzten 8 mg des Substrates verdaut werden; andernfalls verläuft die Reaktion nach höheren oder gebrochenen Ordnungen. Auch das Gesetz Konzentration $\times$ Zeit = const. ist in guter Näherung erfüllt, wie die gestrichelt ein-

gezeichneten Parallelen zur Zeit-Achse wiedergeben (Abb.2).

Der Befund, daß die Kollagenase in Phosphat-Puffer keinen ausgesprochenen "Gipfel" der optimalen Aktivität hat, sondern ein breites "Plateau" zwischen pH 6 bis pH 8, stimmt gut mit dem von M a n d l überein, die pH 6,2 bis 7,8 angibt⁴⁶⁾ (Abb. 3).

2. Kolorimetrische Methode

Die beschriebenen Testmethoden haben erhebliche Nachteile. Wie alle heterogenen Reaktionen sind sie weniger genau als Untersuchungen, die in Lösung durchgeführt werden können. Auch der homogene viskosimetrische Test übernimmt die Fehlerquellen, die mit der Eichung nach dem Suspensions-Verfahren verbunden sind. Der Hauptnachteil der von mir ausgearbeiteten Suspensionsmethode mit anschließender Stickstoffbestimmung ist der Umstand, daß nur in stickstofffreien Puffern gearbeitet werden kann. Diesen Ansprüchen genügt im gewünschten pH-Bereich allen der Phosphatpuffer, der seinerseits aber den Zusatz der aktivierenden Calciumionen nicht zuläßt. So schien die Ausarbeitung einer kolorimetrischen, im homogenen System durchführbaren Bestimmung von Kollagenase dringend nötig.

Voraussetzung hierfür war die genaue Kenntnis der Spezifität des Enzyms. Wie an späterer Stelle ausführlich beschrieben wird, ist sie inzwischen bekannt und läßt sich nach einer Formulierung von G r a ß m a n n u. Mitarb.⁵³⁾ dahingehend zusammenfassen, daß Kollagenase nur Sequenzen der Art



spaltet. Hierbei bedeuten P = Prolin oder Hydroxyprolin, R eine Aminosäure, X und Y Schutzgruppen oder Aminoacylreste.

Unter Zugrundelegung dieser Spezifitätsregel sollte eine kolorimetrische Bestimmung des Enzyms auf folgende Weise möglich sein: Setzt man zur Untersuchung ein Carbobenzoxyl-Peptid ein,

das den Spezifitätsanforderungen genügt, so ist vor und nach Kollagenase-Einwirkung das ursprüngliche Aminoende des Peptids blockiert, also nicht anfärbbar mit Ninhydrin. Die zu einem blauen Farbstoff führende Ninhydrin-Reaktion der Aminosäuren, Peptide und Proteine beruht ja auf einer Umsetzung mit den freien Aminogruppen dieser Stoffe⁵⁴⁾. Farbpositiv ist nur die durch Spaltung in Freiheit gesetzte Aminogruppe des Glycins. Die Voraussetzung für eine quantitative Führung der Ninhydrin-Methodik ist von der Rockefeller-Gruppe um Moore und Stein geschaffen worden⁵⁵⁾.

Als Substrat diente das Carbobenzoxy-Hexapeptid Cbo-Gly-Pro-Gly-Gly-Pro-Ala (zur Synthese des Peptids vgl. ⁵⁶⁾; qualitative Spaltungsversuche s.S. 22). Es bringt neben seiner sehr guten Löslichkeit in wäßrigen Puffern noch eine andere wichtige Voraussetzung für die Problemstellung mit: Das bei der Spaltung entstehende Tripeptid Gly-Pro-Ala tendiert nicht wie Dipeptide, bzw. Dipeptidester oder -amide zur Anhydridbildung, wodurch es sich dem Nachweis mit Ninhydrin entziehen würde (vgl. S. 21).

Wie Abb. 4 zeigt, ergaben Vorversuche, daß die Intensität der Ninhydrinanfärbung des (durch Spaltung entstehenden) Bruchstückes Gly-Pro-Ala in Citratpuffer vom pH 5,0 und pH 6,3 eine lineare Funktion der eingesetzten Peptidkonzentration darstellt.

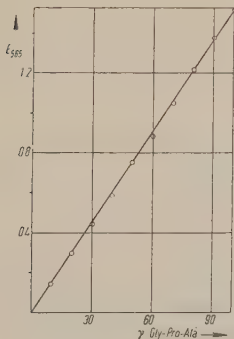


Abb. 4

Anfärbung von Gly-Pro-Ala mit
Ninhydrin

Schichtdicke 1 cm. Substanz gelöst in 0,5 ml 0,1 m Citratpuffer, pH 6,3, der 0,01 m Calciumacetat enthält

Bei Inkubation des Carbobenzoxy-Hexapeptids mit steigenden Mengen Kollagenase in Citratpuffer vom pH 6,3 bei 37° erwies sich nach Abstoppen der Reaktion mit Trichloressigsäure die gemessene Extinktion des Farbstoffs ebenfalls als geradlinig abhängig von der Enzymkonzentration (Abb. 5). Die zeitliche Verfolgung der Reaktion mit steigenden Mengen Kollagenase ergab den für Enzymreaktionen typischen Kurvenverlauf (Abb. 6). Dabei werden nach drei Stunden bei einem Enzym : Substrat-Verhältnis von 1 : 44 etwa 89 % des eingesetzten Substrats gespalten (Abb. 6), nach acht Stunden 98 %.

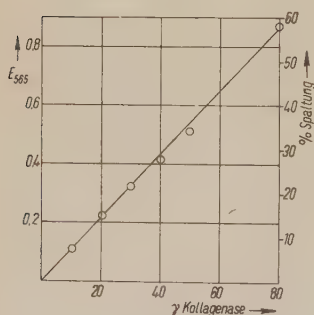


Abb. 5

Anföhrung des bei der Spaltung von Cbo-Gly-Pro-Gly-Gly-Pro-Ala mit Kollagenase entstehenden Spaltstücker mit Ninhydrin

Testbedingungen: 2,0 mg Substrat in 2,5 ml 0,08 m Citratpuffer, pH 6,3, der 0,01 m Calciumacetat enthält; $t = 37^\circ$, 15 min. Anföhrbt wurden 0,3 ml nach Zusatz von 0,1 ml Trichloressigsäure (zur Ninhydrinanföhrung vgl. Exper. Teil)

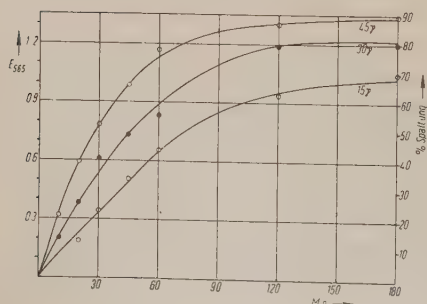


Abb. 6

Spaltung von Cbo-Gly-Pro-Gly-Gly-Pro-Ala mit Kollagenase

Test und Anföhrbedingungen s. Abb. 5

Gemessen wurde jeweils gegen eine unter gleichen Bedingungen mitgelaufene enzymfreie Blindprobe. Wie eine Bestimmung ergab,

wird das Substrat ohne enzymatische Einwirkung nach 15 Min. nur zu 2 %, nach 3 Stunden zu etwa 5 % gespalten.

Als Standardmethode für die quantitative Bestimmung der Kollagenase nach diesem Verfahren⁵⁷⁾ wird die Versuchsdurchführung vorgeschlagen, die im Experimentellen Teil ausführlich beschrieben ist (Versuch 2). Wir definieren als Kollagenase-Einheit diejenige Enzymmenge, die unter den Testbedingungen eine Substratspaltung von 10 %, entsprechend einer Extinktion von 0,150 bei 565 m μ verursacht. Diese Menge löst 0,605 mg Prokollagen unter den in Versuch 1 genannten Versuchsbedingungen.

Die Durchführung der quantitativen Bestimmung ist auf das erwähnte Puffermedium beschränkt. In Citrat-Puffer vom pH 5,0 kann nicht gemessen werden, weil man hier zu weit vom Optimum der Enzymwirkung (pH 6 - 8 in Phosphatpuffer) entfernt ist. In anderen Puffern aber ergab die Ninhydrin-Anfärbung von Gly-Pro-Ala keine lineare Abhängigkeit der gemessenen Extinktion zur Konzentration des Tripeptides. Sowohl in Pyridin/Acetat/ Ca^{++} -Puffer (pH 6,3) als auch in Veronal-Puffer (pH 7,4), Borsäure-Puffer (pH 7,6) und Bicarbonat-Puffer (pH 8,8) wurde eine nach oben gekrümmte Kurve gefunden, was auch bei Glycin und Gly-Gly-Ala der Fall war. Einen gleichartigen, gekrümmten Kurvenverlauf erhält man schon bei Zusatz von 10 % der erwähnten Puffersubstanzen zum Citratpuffer, pH 6,3. Auch Variieren der zum Anfärben verwendeten Menge Ninhydrin und der Entwicklungszeit des Farbstoffes brachte keine Änderung dieser Befunde. Dagegen verursachte ein Zusatz des für die Aktivität von Kollagenase wichtigen Ca-Acetates keine Abweichung vom geraden Verlauf.

Bei der Durchführung des Testes ist man also trotz der schwachen Komplexbildung des Citrats mit den Ca^{++} -Ionen auf diesen Puffer pH 6,3 angewiesen. Nach der Inkubation (37°) färbt man einen aliquoten Anteil der Abbaulösung mit Ninhydrin an und photometriert (genaue Angaben: Versuch 2).

Das Verfahren ist streng spezifisch für Kollagenase. Für eine

proteolytische Spaltung des Substrates kommt allenfalls noch Carboxypeptidase A in Frage. Wie aber nach Befunden am Insulin⁵⁸⁾ zu erwarten war, wird Alanin als direkt vor Prolin stehende Aminosäure von diesem Enzym nicht abgespalten. Nach dreistündiger Inkubation des Cbo-Hexapeptides mit Carboxypeptidase (Verhältnis 50 : 1) in Phosphatpuffer vom pH 7,5 bei 37° konnte gegenüber einem mitgelaufenen Blindwert keine Ninhydrinfarbstoff-Extinktion gemessen werden. Das gleiche Ergebnis hatte ein identischer Ansatz mit Cbo-Gly-Pro-Gly, während unter den gleichen Bedingungen durch Carboxypeptidase aus der Sequenz Cbo-Gly-Phe-Ala das endständige Alanin rasch abgespalten wird, wie qualitative Versuche mit der geschilderten Ninhydrin-Methodik ergaben.

II. Untersuchungen zur Spezifität der Kollagenase

1. Synthetische Peptide

Nach der Reinigung des Bakterienfermentes Kollagenase durch G a l l o p und Mitarb.⁴⁸⁾ stand die Frage seiner Spezifität im Vordergrund. Wie schon auf Seite 7 erwähnt, war bekannt, daß das Enzym nur verschiedene Kollagenarten und ihre Gelatinen verdauen kann, nicht aber andere Proteine wie Fibrin, Keratin, Casein, Hämoglobin, Serumalbumin, Eialbumin, Rinderplasma-Albumin u.a. In eigenen Versuchen wurde gefunden, daß auch das Faserprotein Elastin, das mit Kollagen zusammen bevorzugt in der Papillarschicht der Haut vorkommt, für reine Kollagenase vollkommen unangreifbar ist (Versuch 3). Es war daher zu vermuten, daß die allein auf Kollagen gerichtete Spezifität des Fermentes mit dem besonders hohen Gehalt an Iminosäuren im Zusammenhang stehen mußte.

Nachdem in verschiedenen Arbeitskreisen eine sehr große Zahl synthetischer Peptide auf ihre Spaltbarkeit durch Kollagenase

ohne Erfolg untersucht worden war^{42,46,48,59)}, gaben G a l - l o p und Mitarb.⁶⁰⁾ einen ersten Hinweis. Sie unterwarfen Ichthyocol (Karpfenschwimmbblasen-Kollagen) einem Abbau mit Kollagenase und untersuchten das dabei entstehende Peptidgemisch nach den Methoden von S a n g e r bzw. A k a b o r i auf seine N-terminalen und C-terminalen Endgruppen. Man fand N-endständig ausschließlich Glycin, C-endständig aber zwölf verschiedene neutrale, basische und saure Aminosäuren. Dieselbe Schule konnte außerdem als erste ein synthetisches Produkt, nämlich ein Mischpolymeres von Glycin und Prolin, spalten⁶¹⁾. Diese Versuche gaben einen ersten Hinweis dafür, daß Kollagenase zwar an prolinhaltigen Sequenzen angreift, daß aber die Hydrolyse nicht unmittelbar am Prolin selbst stattfindet.

Dann erschienen in kurzer Folge Befunde über einen Angriff von Kollagenase auf synthetische Peptide. N a g a i und N o d a⁶²⁾ gelang eine Spaltung von Gly-Pro-Leu-Gly-Pro-NH₂ in Gly-Pro-Leu und Gly-Pro-NH₂. H e y n s und L e g l e r⁶³⁾ berichteten über eine Hydrolyse von Cbo-Pro-Ala-Gly-Pro-NH₂ durch Kollagenase in Cbo-Pro-Ala und Gly-Pro-NH₂. Die Autoren beider Arbeitskreise folgerten daraus, daß die kollagenase-spezifische Aminosäuresequenz in spaltbaren Proteinen und Peptiden-Pro-R-Gly-Pro- lauten müßte.

Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, die fast zur gleichen Zeit erhalten wurden, ergänzten diese aufgestellte Regel⁵³⁾. Ich hatte eine große Anzahl mir zur Verfügung stehender Peptide (Tab. II), in der Mehrzahl prolin- und hydroxyprolinhaltige, auf ihre Spaltbarkeit durch Reinkollagenase* untersucht und durch papierchromatographische Prüfung keine Spaltprodukte finden können (Veruch 4 a). Auch die Peptide** Cbo-Pro-Gly-Gly-Pro, Hypro-Gly-Gly-Pro und Iro-Gly-Gly-Pro, die der Spe-

*Dieses Präparat wurde mir dankenwerterweise von Prof.Dr.P.M. G a l l o p, Yeshiva University, New York, zur Verfügung gestellt.

** Cbo- = Carbobenzoxy-

zifitätsregel der japanischen und deutschen Autoren entsprachen, wurden nicht angegriffen.

Tabelle II (entnommen 53)

Untersuchte Peptide, die durch Reinkollagenase nicht gespalten werden*

Freie Dipeptide	Val-gly	Gly-pro
Freie Tripeptide	Gly-phe-gly	Val-gly-lys
	Gly-phe-ser	Gly-gly-pro
	Pro-gly-phe	Gly-gly-hydro
	Leu-gly-pro	
Freie Tetrapeptide	Hydro-gly-gly-pro	Gly-pro-hydro-gly
	Pro-gly-gly-pro	Gly-pro-pro-gly
	Pro-hydro-gly-gly	
Substituierte Dipeptide	Cbo-hydro-gly	Cbo-pro-phe-NH ₂
	Cbo-pro-gly	Cbo-gly-pro-OCH ₃
	Cbo-pro-hydro	
Substituierte Tripeptide	Gly-gly-pro-OCH ₃	
	Cbo-gly-gly-hydro	
	Cbo-gly-gly-pro-OCH ₃	
	Cbo-pro-gly-phe-OCH ₃	
	Cbo-gly-gly-hydro-OCH ₃	
	N ² ,N ⁴ -Bis-Cbo-lys-pro-gly-O-Bz	
Substituierte Tetrapeptide	Cbo-pro-hydro-gly-gly	
	Cbo-pro-gly-gly-pro	
	Cbo-gly-pro-pro-gly	
	Cbo-leu-gly-gly	
Substituiertes Pentapeptid	N ² -Cbo-(im-Bz-his)-pro-phe-(im-Bz-his)-leu-OCH ₃	

Dagegen traten bei der Einwirkung von Kollagenase auf Cbo-Hydro-Gly-Gly-Pro-OCH₃ in Ammonacetatpuffer vom pH 7,5 - 8,0 Spaltstücke auf (Versuch 4b; Abb. 7). Nach 23stündiger Inkubation wurden papierchromatographisch im Lösungsmittel Butanol:Eisessig:Wasser = 4:1:5 und Anfärbung mit Chlor und o-Tolidin⁶⁴⁾ zwei Flecken mit den R_f-Werten 0,16 und 0,50 gefunden. Mit Ninhydrin gaben beide Verbindungen keine Reaktion. Die erste war identisch mit mitgelaufenem Cbo-Hydro-Gly. Beim anderen Fleck konnte es sich nur um ein Sekundärprodukt des erwarteten Di-

* Diese und die übrigen synthetischen Peptide verdanke ich den Herren Dr. E. Wunsch und Dr. E. Hacker von der Peptidchemischen Abteilung unseres Hauses.

peptidesters Gly-Pro-OCH₃ handeln, der sich offenbar unter den schwach alkalischen Versuchsbedingungen zu seinem Anhydrid cyclisiert hatte. Nach kürzerer Inkubationszeit (6 Stunden) ließ sich noch ein weiterer Fleck mit R_f 0,42 feststellen, den ich auf Grund seiner positiven Ninhydrinreaktion noch nicht cyclisiertem, freiem Dipeptidester zuordnete.

Abb. 7

Spaltversuch von Cbo-Hypro-Gly-Gly-Pro-OCH₃ mit Reinkollagenase:

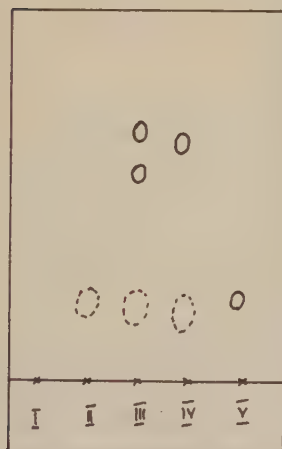
Papierchromatographie der gefriergetrockneten Lösung.

Laufmittel: Butanol:Eisessig:Wasser
= 4 : 1 : 5

Papier: Schleicher und Schüll 2043 b

Anfärbung: nach Reindl und Hoppe

aufgetragen bei Blind- und Testprobe jeweils 70 - 80 γ Substanz.



I Cbo-Hypro-Gly-Gly-Pro-OCH₃, Inkubation ohne Kollagenase 6 Stunden

II dito, Inkubation 23 Stunden

III Cbo-Hypro-Gly-Gly-Pro-OCH₃, Inkubation mit Kollagenase 6 Stunden

IV dito, Inkubation 23 Stunden

V Cbo-Hypro-Gly

Um die Identität des zweiten Spaltstückes nach 23stündiger Inkubation zu sichern, wurde das vermutete Diketopiperazin synthetisiert (Versuch 4c). Das erhaltene Produkt zeigte wie erwartet mit Ninhydrin keine Färbung und wies in einem getrennten Versuch im erwähnten Lösungsmittel einen einzigen Fleck mit einem R_f-Wert von 0,55 auf (Anfärbung nach Reindl - Hoppe; Abb. 26, S. 77).

Damit war die Spaltung von Cbo-Hypro-Gly-Gly-Pro-OCH₃ in Cbo-Hypro-Gly- und Gly-Pro-OCH₃ durch Kollagenase unter den genannten Bedingungen nachgewiesen. Das bedeutet, daß Prolin in Stel-

lung 1 der kollagenasespaltbaren Aminosäuresequenz -Pro-R[↓]Gly-Pro- durch Hydroxyprolin ersetzt sein kann. Ferner wurde damit gezeigt, daß die Aminosäure R auch Glycin sein kann. Zieht man außerdem die in Tab. II aufgeführten nichtspaltbaren Tetrapeptide Pro-Gly-Gly-Pro und Cbo-Pro-Gly-Gly-Pro in Betracht, muß man folgern, daß die beiden Enden der spaltbaren Vierersequenz wie im Kollagen nicht frei vorliegen dürfen, sondern durch Aminosäuren oder andere Gruppierungen geschützt sein müssen. Man kommt so zu der Formulierung



für die kollagenasespaltbare Aminosäurenfolge⁵³⁾, wobei P Prolin oder Hydroxyprolin, R eine beliebige Aminosäure und X bzw. Y Schutzfunktionen bedeuten. (Näheres siehe Diskussion).

Diese erweiterte Fassung der Spezifitätsregel für Kollagenase wurde durch die Spaltung eines zweiten Peptids, Cbo-Gly-Pro-Gly[↓]Gly-Pro-Ala mit reiner Kollagenase in Pyridinacetatpuffer vom pH 6,3 erhärtet (Versuch 4d). Bei diesem Substrat kann das abgespaltene Bruchstück Gly-Pro-Ala in unveränderter Form nachgewiesen werden, da es keine Cyclisierung erleidet. Zur Vermeidung von Nebenreaktionen wurde bei etwas niedrigerem pH als im vorhergehenden Versuch gearbeitet. Nach drei- und sechsständiger Inkubation mit Kollagenase bei 37° wurde papierchromatographisch in zwei verschiedenen Lösungsmitteln je ein Fleck gefunden, der mit synthetischem Gly-Pro-Ala identisch war. Das Cbo-Kopfstück (Cbo-Gly-Pro-Gly) wanderte hier mit der Front und war somit nicht nachweisbar (Abb. 8a und 8b).

Über die Verwendung dieses Ergebnisses zu einer quantitativen, kolorimetrischen Bestimmung von Kollagenase ist bereits berichtet worden (s.S. 14 ff.).



Abb. 8a

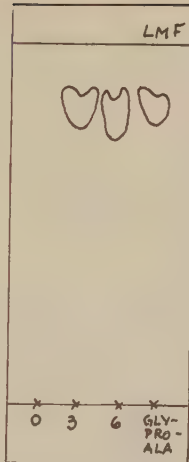


Abb. 8b

Spaltungsversuch von Cbo-Gly-Pro-Gly-Gly-Pro-Ala mit Reinkollagenase:

Papierchromatographie der Abbaulösung

aufgetragen je 300 γ Substanz

Papier: Whatman Nr. 1; Anfärbung: Ninhydrin

Laufmittel a: Butanol:Essig:Pyridin:Wasser = 30:6:20:24

" b: Phenol : Wasser = 3 : 1

2. Natürlich vorkommendes Material

a) Prokollagen

Die Versuche über die Spezifität von Kollagenase an synthetischen Substraten haben gezeigt, daß die Spezifität des Enzyms sehr eng an die Struktur -P-R-Gly-P- gebunden ist (P = Prolin oder Hydroxyprolin). Bei der Einwirkung von Kollagenase auf Kollagen ist

daher zu erwarten, daß Peptidsequenzen des Kollagens, die obigem Postulat entsprechen, gespalten werden. Solche Sequenzen wird man vor allem in den apolaren Bereichen des Kollagens vermuten, die bisher wegen ihrer Unangreifbarkeit für andere Enzyme einer Untersuchung nur sehr schwer zugänglich waren. Die Bestimmung der Aminoendgruppen, die bei der Spaltung von Kollagen mit Kollagenase freigesetzt werden, und der Aminosäuren in zweiter und dritter Position nach den Endgruppen sollte einen tieferen Einblick in den Aufbau der apolaren Bereiche des Kollagens gestatten.

Auf diese Weise sollten zugleich auch andere Fragen der Kollagenasespezifität zu beantworten sein, die auf Grund der Untersuchungen an synthetischen Peptiden noch nicht vollständig geklärt erschienen. Fragen dieser Art sind z.B. die Ersetzbarkeit der beiden Prolin-Reste durch Hydroxyprolin (s.S. 22 und S. 58) oder die des Glycins durch ähnlich gebaute neutrale Aminosäuren, wie Alanin, Serin, Leucin; und schließlich die Frage, ob hinsichtlich der in der obigen Sequenz mit R bezeichneten Aminosäure besondere Spezifitätsforderungen bestehen.

Was wußte man bisher über die Verhältnisse am Aminoende nach Kollagenase-Spaltung? Durch enzymatischen Abbau mit Kollagenase hatten G a l l o p ⁶⁰⁾ am Aminoende von Ichthyocolpeptiden ausschließlich Glycin gefunden, H e y n s ⁶³⁾ an Knochenkollagen überwiegend Glycin neben sehr kleinen Mengen von Valin, Asparaginsäure und Glutaminsäure. M a n d l schließlich erhielt an Sehnenkollagen neben 90 % Glycin auch 10 % Alanin ⁶⁵⁾.

Prokollagen, die säurelösliche Vorstufe reifen Kollagens, wurde in eigenen Versuchen mit Reinkollagenase in Pyridin-Acetatpuffer abgebaut (Versuch 5 beschreibt diesen Abbau sowie alle sich daran anschließenden chromatographischen Untersuchungen und Berechnungen) und das gefriergetrocknete Peptidgemisch einer Aminoendgruppenbestimmung nach S a n g e r ⁶⁶⁾ (DNP-Methode) unterworfen. Es zeigte sich, daß neben sehr viel Glycin geringe Mengen Alanin, Glutaminsäure und Asparaginsäure angetroffen werden (Abb. 9). Durch Elution nach der papierchromatographischen Trennung, Berechnung der molaren Extinktionskoeffizienten

an synthetischem Material sowie der Ausbeute bei Dinitrophenylierung von Aminosäuren und ihrer anschließenden Papierchromatographie ließen sich größenordnungsmäßig die prozentualen Anteile der N-terminalen Aminosäuren angeben. Es wurden 97 % Glycin, 2 % Alanin und je 0,5 % Asparaginsäure und Glutaminsäure gefunden.

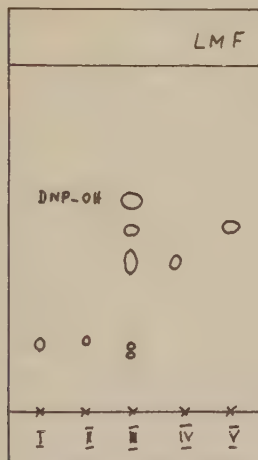


Abb. 9

Aminoendständige Aminosäuren in
Prokollagen nach Abbau mit Rein-
kollagenase: DNP-Methode.

Laufmittel: iso-Amylalkohol:Pyridin:
Wasser = 28:25:21

Papier: Schleicher und Schüll 2043 b,
pH 5 gepuffert.

I DNP-Asparaginsäure

II DNP-Glutaminsäure

III Dinitrophenyliertes Abbaugemisch

IV DNP-Glycin

V DNP-Alanin

Quantitative Berechnungen, besonders Absolutangaben, auf der Basis der DNP-Methode sind allerdings ungenau, weil sie wegen der schlechten Ausbeuten und anderer Fehlerquellen zu großen Ungenauigkeiten tendieren. Zur Berechnung der beim enzymatischen Abbau freigesetzten Mole Endgruppen mußte eine verlässlichere quantitative Methode herangezogen werden; das schien auch noch aus einem anderen Grunde angezeigt. In der zweiten Position vom Aminoende her waren ja Prolin und Hydroxyprolin zu erwarten. Bei der Bestimmung dieser Iminosäuren nach der DNP-Methode müssen aber große Verluste, nämlich bis zu 90 % in Kauf genommen werden⁶⁷⁾, was naturgemäß quantitatives Arbeiten sehr problematisch macht, besonders an so komplizierten Gemischen wie dem vorliegenden.

Um nun auch zu mengenmäßigen Angaben über die Aminosäuren in den einzelnen Positionen an den Spaltstellen des Kollagens zu

kommen, wurde die Methode der Restpeptid-Bestimmung durch quantitative Aminosäureanalyse nach Edman-Abbau in Betracht gezogen. Sie ist inzwischen auch von den Arbeitskreisen von Moore und Stein⁶⁸⁾ und von Schramm⁶⁹⁾ mit Erfolg zur Aufklärung der Primärstrukturen von Ribonuclease, bzw. des Proteins des Tabakmosaikvirus herangezogen worden. Man geht dabei so vor, daß man durch Umsetzung des Peptids oder des Peptidgemisches mit Phenylsenföhl bei alkalischer Reaktion ein Phenylthiocarbamyl-Derivat des Peptids entstehen läßt, das dann im Zuge einer Cyclisierungsreaktion bei saurem pH die N-terminale Aminosäure als Thiohydantoin abspaltet (schrittweiser Abbau nach Edman⁷⁰⁾). Das Ausgangsmaterial und die durch systematischen Abbau erhaltenen "Restpeptide" werden jeweils der quantitativen Aminosäureanalyse unterworfen. Die bei den Restpeptiden auftretenden Verminderungen bestimmter Aminosäuren geben qualitativ und quantitativ die N-terminalen Aminosäuren der vorhergehenden Stufen an. Die quantitative Bestimmung der abgespaltenen Thiohydantoin selbst ist problematisch und erst in allerjüngster Zeit nach Fertigstellung dieser Disseration befriedigend gelöst worden⁷¹⁾.

Die angeführte Arbeitsweise ist an Peptidgemischen aber nur dann anwendbar, wenn zu erwarten ist, daß beim Phenylthiohydantoinabbau lediglich eine oder wenige Arten von Aminosäuren abgespalten werden. In einem solchen Falle wird die abgespaltene Aminosäure im Restpeptidgemisch in geringerer Menge gefunden, während der Gehalt an allen übrigen Aminosäuren gleichmäßig etwas erhöht erscheint. Verteilen sich die abgespaltenen Aminosäuren rein statistisch, so beobachtet man im zurückbleibenden Peptidgemisch keine Änderungen der Aminosäurezusammensetzung und kann daraus auch keine Schlußfolgerungen ziehen.

Die Voraussetzung, daß im Abbaugemisch - das also ohne Auftrennung verwendet wurde - im wesentlichen nur eine Aminosäure als abspaltbare Endgruppe vorliegt, war nach den oben angeführten Ergebnissen (DNP-Methode) gegeben. Eine weitere Voraussetzung war die Möglichkeit zur quantitativen Aminosäurebestimmung. Hier stand mir in unserem Institut eine Trennapparatur auf

Tabelle III a:

Quantitative Aminosäureanalysen von Prokollagen und den Restpeptiden nach Spaltung mit Kollagenase und schrittweisem Edman-Abbau.

Aminosäureangaben in Mol pro 100 Mol Aminosäuren

	Prokollagen (P ₀)	Restpeptide nach Edman-Abbau			P ₁ /P ₀
		1. Stufe (P ₁)	2. Stufe (P ₂)	3. Stufe (P ₃)	
Asp . . .	4,89	5,45	6,46	8,59	1,115*
Glu . . .	8,19	8,93	10,10	12,01	1,09*
Gly . . .	31,80	21,90	27,50	19,90	0,69
Ala . . .	10,52	13,10	12,31	11,69	1,245*
Ser . . .	3,56	4,37	4,41	4,61	1,23*
Thr . . .	1,88	2,31	2,54	2,66	1,23*
Tyr . . .	0,49	0,38	0,25	—	0,78
Val . . .	1,98	2,64	3,37	3,11	1,33*
Met . . .	0,19	0,64	0,56	—	3,34
Ileu . . .	1,19	1,36	1,49	1,27	1,14*
Leu . . .	2,79	2,97	2,61	2,99	1,06*
Phe . . .	1,43	1,60	1,64	1,42	1,12*
Pro . . .	14,63	16,49	4,50	5,54	1,125*
Hyp ^o . .	8,53	9,86	12,34	14,30	1,155*
His . . .	0,57	0,58	1,15	2,68	1,02
Lys . . .	2,58	2,53	1,89	0,74	0,98
Hyl ^{ys} . .	0,51	—	0,10	—	—
Arg . . .	4,27	4,89	6,98	8,49	1,145*

* Zur Mittelwertbildung herangezogene Faktoren (vgl. Text).

Ionenaustauscher-Basis mit automatischer Registrierung der Ergebnisse in der Konstruktion von H a n n i g ⁷²⁾ * zur Verfügung.

Das Abbaugemisch, in den Tabellen IIIa und IIIb als P₀ bezeichnet, wurde nach Versuch 6 einem Edman-Abbau unterworfen. Um ganz sicher zu gehen, daß alle Endgruppen vollständig erfaßt werden, setzte ich jede Stufe zweimal mit Phenylsenfö^l um. Nach

* Herrn Dr. K. H a n n i g und seinem Laboratorium möchte ich für die Durchführung aller quantitativen Aminosäureanalysen dieser Dissertation sehr herzlich danken.

Tabelle IIIb:

Auf das Ausgangsmaterial umgerechnete Aminosäureanalysen der Restpeptide eines Kollagenasehydrolysats von Prokollagen nach schrittweisem Edman-Abbau.

P_1' , P_2' , P_3' = umgerechnete Werte von P_1 , P_2 , P_3 (Tab. IIIa);

Umrechnungsfaktoren: $P_1:P_0 = 1,16$; $P_2:P_0 = 1,39$; $P_3:P_0 = 1,72$

	Pro- kollagen (P_0)	Mol pro 1. Stufe (P_1')	100 Mol Aminosäuren 2. Stufe (P_2')	3. Stufe (P_3')	$P_1' - P_0$	$P_2' - P_1'$	$P_3' - P_2'$
Asp	4,89	4,69	4,55	4,98	-0,20	-0,14	+0,43
Glu	8,19	7,68	7,25	6,96	-0,51	-0,43	-0,29
Gly	31,80	18,80	19,80	11,52	-13,0	+1,00	-8,28
Ala	10,52	11,25	8,86	6,77	+0,73	-2,39	-2,09
Ser	3,56	3,76	3,18	2,68	+0,20	-0,58	-0,50
Thr	1,88	1,99	1,83	1,54	+0,11	-0,16	-0,29
Tyr	0,49	0,33	0,18	—	-0,16	-0,15	-0,18
Val	1,98	2,27	2,42	1,80	+0,29	+0,15	-0,62
Met	0,19	0,55	0,40	—	+0,36	-0,15	-0,40
Ileu	1,19	1,17	1,07	0,74	-0,02	-0,10	-0,33
Leu	2,79	2,56	1,81	1,73	-0,23	-0,75	-0,08
Phe	1,43	1,38	1,11	0,82	-0,05	-0,27	-0,57
Pro	14,68	14,20	8,24	8,21	-0,43	-10,90	-0,03
Hypro	8,53	8,49	8,87	8,30	-0,04	+0,38	-0,57
His	0,67	0,50	0,83	1,55	-0,07	+0,33	+0,72
Lys	2,68	2,18	1,36	0,43	-0,40	-0,82	-0,93
Hyllys	0,51	—	0,07	—	—	—	—
Arg	4,27	4,20	5,00	4,92	-0,07	+0,80	-0,08

Cyclisierung in Eisessig und Ausschütteln der abgespaltenen Thiohydantoine mit Essigester wurde die wäßrige Phase gefriergetrocknet. Ein Teil dieses Trocknungsrückstandes wurde nun abgetrennt, hydrolysiert und die Aminosäurezusammensetzung des Restpeptides nach erstem Edman-Abbau (Bezeichnung in den Tab.: P_1) analysiert (Versuch 7), der Rest erneut mit Phenylsenföly umgesetzt. Auf diese Weise wurden aus dem Gesamtabbauemisch des Prokollagens mit Kollagenase schrittweise jeweils die drei ersten Aminosäuren abgespalten. Die entstandenen Restpeptide sind in der Tab. IIIa mit P_1 , P_2 und P_3 bezeichnet.

Für eine quantitative Angabe der abgespaltenen Aminosäuren müssen die Analysenzahlen der Tab. IIIa, die sich auf Prozente des jeweils vorliegenden Restpeptidgemisches (also nicht des ursprünglichen Kollagens) beziehen, erst umgerechnet werden. Die Rechnung kann entweder auf die Abnahme der relativen Menge des Glycins oder auf die Zunahme der übrigen Aminosäuren aufgebaut werden.

Die Menge x des beim ersten Abbauschritt abgespaltenen Glycins in Mol pro 100 Mol Aminosäuren kann aus den Glycinwerten des Prokollagens (Gly_0) und des mit Phenylisothiocyanat einmal abgebauten Kollagenasehydrolysats (Gly_1) ermittelt werden, unter der oben weitgehend bestätigten Voraussetzung, daß Glycin praktisch als einzige Endgruppe auftritt. Es gilt die Beziehung:

$$Gly_1 = \frac{(Gly_0 - x) \cdot 100}{100 - x} .$$

Nachdem für $Gly_1/Gly_0 = 0,69$ gefunden wurde (Tab. IIIa, Spalte 6), errechnet sich x zu 12,6. Das bedeutet, daß auf 100 Aminosäuren bzw. 100 Peptidbindungen 12,6 Mol Glycin abgespalten werden. Da, wie oben gezeigt wurde, das Glycin etwa 97 % der Endgruppen ausmacht, liegt die Menge der insgesamt gespaltenen Bindungen recht genau bei 13 Mol pro 100 Mol Aminosäuren. Daraus errechnet sich, daß der relative Anteil der übrigen, vom Abbau nicht betroffenen Aminosäuren um den Faktor

$$P_1/P_0 = \frac{100}{100 - 13} = 1,15$$

angestiegen sein muß. Den Faktor P_1/P_0 kann man auf etwas breiterer statistischer Basis auch aus der relativen Zunahme der vom Abbau nicht erfaßten Aminosäuren errechnen. Dabei müssen jedoch die Werte für Lysin, von dem bereits durch H i r s , M o o r e und S t e i n ⁶⁸⁾ bekannt ist, daß es beim Phenylisothiocyanat-Abbau Verluste erleidet, und für die in sehr geringer Menge in

Prokollagen vorkommenden Aminosäuren Tyrosin, Methionin, Histidin und Hydroxylysin, deren quantitative Bestimmung wegen ihrer geringen Menge ($\approx 0,6$ Mol/100 Mol Aminosäuren) mit größeren Fehlerquellen behaftet sind, außer Betracht bleiben. Der Mittelwert für die übrigen Aminosäuren, die in Tab. IIIa mit * bezeichnet sind, wird zu 1,165 gefunden, d.h., es werden von Kollagenase im Prokollagen auf 100 Aminosäuren 14 Peptidbindungen gelöst.

Die Faktoren für den zweiten und dritten Abbauschritt wurden entsprechend errechnet:

$$P_2/P_0 = \frac{100}{100 - 2 \cdot 14} = 1,39; \quad P_3/P_0 = \frac{100}{100 - 3 \cdot 14} = 1,72.$$

Diese Errechnung der Faktoren für den 2. und 3. Abbauschritt ist nur dann streng zulässig, wenn man einen gleichmäßigen Verlust an Aminosäuren bei jedem Abbauschritt voraussetzt. Das trifft aber offenbar nicht zu. Der Anteil des Glycins in P_2 findet sich nach der Korrektur gegenüber P_1 etwas erhöht. Diese Diskrepanz erklärt sich sicherlich damit, daß im Zuge des ersten Edman-Abbaus unspezifische Spaltungen und damit zusätzliche Endgruppen aufgetreten sind, wie man dies auch aus der Literatur kennt^(68,73). Für eine die tatsächlichen Verhältnisse genauer beschreibende Angabe müßte man deshalb wahrscheinlich mit einem grösseren Faktor rechnen.

In der ersten Position am Aminoende des Peptidgemisches steht nach diesen Ergebnissen ausschließlich Glycin. Die Verluste an allen anderen Aminosäuren sind mit Ausnahme der Glutaminsäure so gering, daß sie innerhalb der Fehlergrenze der Bestimmungsmethode liegen, was auch das Auftreten einiger Fluswerte bestätigt.

In der zweiten Stufe des Peptidgemisches findet man Prolin stark verringert. Geringere Mengen Alanin, Serin, Leucin und Glutaminsäure wurden beim Abbau ebenfalls entfernt, dagegen überraschenderweise nicht Hydroxyprolin. Die geringen Anteile der zuletzt genannten Aminosäuren dürften eventuell auf unspezifische Kol-

lagenase-Spaltungen nach der Art der an synthetischen Peptiden gemachten Befunde zurückzuführen sein^{63,74}). Näheres findet sich in der Diskussion der Ergebnisse (s.S. 60).

Um zu klären, ob Hydroxyprolin vielleicht - im Gegensatz zum Prolin - beim Edman-Abbau anomal reagiert, wurde synthetisches Hydro-Gly den gleichen Reaktionen unterworfen wie das Abbau-Peptidgemisch (Edman-Abbau, quantitative Aminosäureanalyse). Es zeigte sich, (Versuch 6b), daß die quantitative Entfernung des Hydroxyprolins keine Schwierigkeiten bereitet. Auch wird zu diesem Punkt auf die Diskussion verwiesen.

Nach dem 3. Abbauschritt findet man wiederum zur Hauptsache Glycin neben geringeren Anteilen Alanin vermindert, während die Abnahmen bei Serin, Threonin, Valin, Methionin, Isoleucin, Phenylalanin, Hydroxyprolin und Glutaminsäure schon innerhalb der Fehlergrenze liegen und nicht mehr mit Sicherheit angebbare sind. Die überwiegende Mehrzahl von ihnen ist schon von anderen Bearbeitern^{60,63}) carboxylendständig an Kollagenase-Abbaugemischen von Prokollagen gefunden worden. Bei der Möglichkeit einer durchlaufenden Aminosäurefolge -Gly-Pro-R- (s. Seite 68) würden die gleichen Aminosäuren auch in dritter Position nach den kollagenase-spaltbaren Stellen auftreten. Das könnte für eine unspezifische Verteilung vieler Aminosäuren auf die Position R in den Neutralbereichen der Faser sprechen. Auch hierauf wird in der Diskussion noch näher eingegangen werden, ebenso auf andere Befunde amerikanischer Arbeitsgruppen^{75,76,77}), die in Einklang mit den erhaltenen Ergebnissen zu bringen sind.

Eine Bestätigung der Annahme, daß den tatsächlichen Verhältnissen wahrscheinlich ein niedrigerer Umrechnungsfaktor besser gerecht wird, ergibt die qualitative Chromatographie der Aminosäuren, die man nach saurer Aufspaltung der Phenylthiohydantoine erhält. (Zur Versuchsdurchführung vgl. Versuch 8d). Diese Untersuchung zeigt für die Position 2 wie erwartet sehr viel Prolin (wegen der gelben Farbe in der photographischen Wiedergabe schlecht sichtbar), etwas Ala, Ser, Leu und Glutaminsäure neben Spuren von Hydroxy-

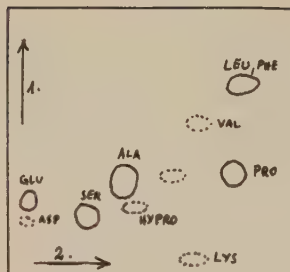


Abb. 10

Rückspaltung der Phenylthio-
hydantoine zu den Aminosäuren (2. Abbaustufe)

Zweidimensionale Papierchromatographie

1. Laufmittel:
Butanol:Eisessig:Wasser =
4 : 1 : 5
2. Laufmittel:
Phenol:Kresol:Wasser =
1 : 1 : 2 (+NH₃, KCN)

Anfärbung: Ninhydrin

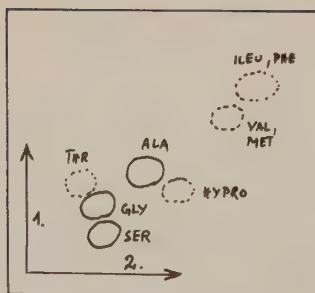


Abb. 11

Rückspaltung der Phenylthio-
hydantoine zu den Aminosäuren (3. Abbaustufe)

Zweidimensionale Papierchromatographie

Laufmittel und Anfärbung
wie oben

prolin und Asparaginsäure, sowie kleine Mengen von Tyrosin, Lysin, Methionin und möglicherweise auch Phenylalanin an (Abb. 10). Alle diese Aminosäuren, mit Ausnahme des nur ungenau zu bestimmenden Hydroxyprolins, werden laut Tab.IIIb tatsächlich in kleinen Mengen abgespalten.

Das gleiche ergibt sich für den nächsten Abbauschritt. Alle für die 3. Position als unsicher angegebenen Aminosäuren finden sich nach Rückspaltung der Phenylthiohydantoine als Aminosäuren am Chromatogramm wieder (Abb. 11).

Beweise für Glycin in Position 1 und Prolin in Position 2 ergaben sich auch noch an anderen Materialien (s. die folgenden Abschnitte).

b) Enzymatisch angereicherte Neutralbereiche von Prokollagen

Die im vorhergehenden Abschnitt beschriebenen Resultate sind eine weitere starke Stütze für die Annahme eines diskontinuierlichen Aufbaus der Kollagenfaser, nämlich für das Vorhandensein von neutralen und polaren Bereichen. In unserem Institut wurde versucht, durch Abbau von Prokollagen mit verschiedenen Proteasen und Peptidasen, deren Spezifität im Gegensatz zur Kollagenase nicht auf prolinhaltige Bezirke eingestellt ist, die hierbei ungespalten bleibenden apolaren Teile anzureichern. Das wurde durch nacheinanderfolgende Einwirkung von Pepsin, Trypsin, Chymotrypsin, Aminopeptidase und Carboxypeptidase auf Prokollagen und Isolierung des dabei unangegriffenen Peptidgemisches erreicht⁷⁸⁾. Wie Aminosäureanalyse, (Tab. IV), zeigt ein Anwachsen des Anteils der Iminosäuren von 23,16 Mol % im Prokollagen auf 28,54 Mol % in diesem, Substanz Q genannten Material.

Dieses iminosäuren-angereicherte Material* wurde in gleicher

* von Herrn Dipl.Chem. P. Polлак freundlicherweise zur Verfügung gestellt, wofür ihm an dieser Stelle herzlich gedankt sei

Tabelle IV: Quantitative Aminosäureanalysen der Substanz Q und ihrer Restpeptide nach Spaltung mit Kollagenase und schrittweisem Edman-Abbau

Aminosäureangaben in Mol / 100 Mol Aminosäuren

Q = enzymatisch angereicherte Neutralbereiche von Prokollagen

* = zur Mittelwertbildung herangezogene Faktoren

Q₀ = Q nach Entfernung der N-terminalen Aminosäuren (Edman-Abbau)

Q₁, Q₂ = mit Kollagenase hydrolysierte und einmal bzw. zweimal nach Edman abgebaute Substanz Q
 Q₁, Q₂ = umgerechnete Werte von Q₁ und Q₂ (Umrechnungsfaktoren Q₁:Q₀ = 1,14; Q₂:Q₀ = 1,32;
 vgl. hierzu Tabelle IIb)

	Q	Q ₀	Restpeptide n. Edman-Abbau		$\frac{Q_1}{Q_0}$	Ungerechnete Werte		$Q_1' - Q_0$	$Q_2' - Q_1'$
			1. Stufe (Q ₁)	2. Stufe (Q ₂)		1. Stufe (Q ₁)	2. Stufe (Q ₂)		
Asp	5,56	5,15	6,05	6,66	1,175*	5,32	5,06	+ 0,17	- 0,26
Glu	9,46	9,15	9,60	12,10	1,05*	8,45	9,20	- 0,70	+ 0,75
Gly	31,8	31,10	21,81	26,80	0,70	19,20	20,20	- 11,90	+ 1,00
Ala	9,97	10,38	10,54	10,45	1,015*	9,28	7,94	- 1,10	- 1,34
Ser	3,59	3,76	4,14	5,10	1,10	3,64	3,88	- 0,12	+ 0,24
Thr	1,27	1,18	1,45	1,58	1,23*	1,10	1,10	+ 0,10	- 0,18
Tyr	-	0,12	0,07	0,21	0,58	0,06	0,16	+ 0,06	+ 0,10
Val	1,37	1,17	1,42	1,27	1,21*	1,25	0,97	+ 0,08	- 0,28
Met	0,25	0,17	-	0,48	-	-	0,36	-	+ 0,36
Ileu	0,54	0,52	0,59	0,59	1,13*	0,52	0,45	0	- 0,07
Leu	1,19	1,42	1,42	0,95	1,00*	1,25	0,72	- 0,17	+ 0,53
Phe	0,25	0,36	0,63	0,36	1,71*	0,56	0,27	+ 0,20	- 0,29
Pro	16,74	16,74	18,77	6,26	1,12*	16,50	4,76	- 0,24	- 11,74
Hypro	11,80	14,40	17,95	20,68	1,245*	15,80	15,72	+ 1,40	- 0,08
His	0,25	0,39	0,81	1,35	2,08	0,71	1,03	+ 0,32	+ 0,32
Lys	2,83	1,70	1,52	1,30	0,895	1,34	0,99	- 0,36	- 0,35
Hylys	1,09	0,24	0,64	0,25	2,66*	0,56	0,19	+ 0,32	- 0,37
Arg	2,03	2,05	2,59	3,12	1,26*	2,28	2,37	+ 0,23	+ 0,09

Weise, wie beim Prokollagen beschrieben, mit Kollagenase hydrolysiert und schrittweise nach E d m a n abgebaut; die Restpeptide wurden der quantitativen Aminosäureanalyse unterworfen. Allerdings reichte die Substanz nur für zwei Abbaustufen aus. Die Korrekturfaktoren waren hier 1,74 für die erste Stufe (wie beim Prokollagen als Mittelwert errechnet) und 1,32 für die zweite Stufe (wie dort auf einen konstanten Eiweißverlust bezogen).

Die Ergebnisse stimmen mit denen am Prokollagen qualitativ und quantitativ gut überein (Tabelle IV). In erster Stufe wird demnach Glycin neben vergleichsweise kleineren Mengen Alanin und Glutaminsäure abgespalten, in der zweiten Position Prolin neben geringeren Beträgen von Alanin und Leucin.

Dieses Ergebnis bestätigt zwar die im Abschnitt a) gezogenen Folgerungen für die geordneten Bereiche (vgl. auch Diskussion); es ist aber keineswegs selbstverständlich. Denn anders als im Prokollagen, bei dem man ohne größeren Fehler die Kettenlänge als unendlich annehmen darf, stehen in diesem Peptidgemisch schon v o r der Kollagenaseeinwirkung eine größere Zahl von freien Aminoendgruppen zur Verfügung. Die Versuche besagen nun offenbar, daß auch diesen, schon vor dem Kollagenase-Abbau vorhandenen Aminoenden die Sequenz Gly-Pro zukommt. Dies ist nicht allzu überraschend, denn das Material war ja bei seiner Gewinnung einem erschöpfenden Abbau mit Aminopolypeptidase unterworfen worden, der offenbar an der Gruppierung Gly-Pro, also zwei Positionen vor einer Iminosäure zum Stillstand kommt - wenn man will, an der Grenze der geordneten und ungeordneten Bereiche.

c) Neutralpeptid N_{VI}/v

Ferner stand mir ein Peptid zur Verfügung, das aus Prokollagen nach tryptischer Spaltung durch elektrophoretische und säulenchromatographische Trennung der Fraktionen gewonnen worden war^{30,31)}. Es war aus der Gruppe der neutralen Komponenten

isoliert worden, genügte scharfen Reinheitsanforderungen und führte die Laborbezeichnung $N_{VI/V}$. Seine Zusammensetzung war folgende:

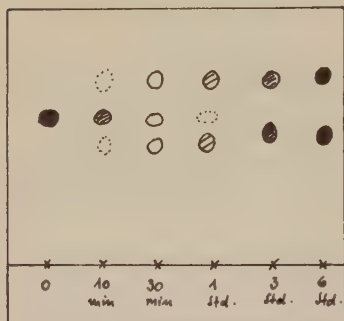
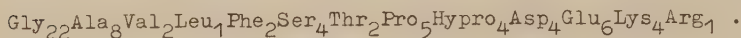


Abb. 12

Kollagenase-Spaltung des
Kollagenpeptids $N_{VI/V}$

aufgetragen je 200 μ Substanz
Papier: Schleicher-Schüll 2043b
Anfärbung: Ninhydrin

Laufmittel: Butanol:Pyridin:
Eisessig:Wasser =
4 : 4 : 1 : 5

t = 0, 10, 30 Min., 1 Std.,
3 Std., 6 Std.

Dieses Peptid wurde in Pyridin/Acetat-Puffer mit Reinkollagenase abgebaut (Versuch 8a). Aliquote Anteile wurden dem Ansatz zu den bei Abb. 12 angegebenen Zeiten entnommen und zusammen mit entsprechenden Mengen einer enzymfreien Blindprobe chromatographiert. Man kann dem Chromatogramm entnehmen, wie das ursprüngliche Peptid nach und nach verschwindet und dafür zwei Bruchstücke immer stärker in Erscheinung treten.

Nach der DNP-Methode ist die N-terminale Aminosäure des Peptids vor dem Abbau Glycin (Abb. 13a). Nach Kollagenase-Einwirkung sollte also nach der DNP-Methode gleichfalls nur Glycin gefunden werden. Das ist tatsächlich der Fall (Abb. 13b); eine quantitative Bestimmung von DNP-Glycin zeigte außerdem, daß die Menge des aminoendständigen Glycins dabei auf etwa das Doppelte angewachsen ist (s. dazu Versuch 8b). Nach Edman-Abbau (Versuch 8c) findet man bei erneuter Dinitrophenylierung für die zweite Position wie erwartet Prolin, daneben noch zwei weitere Flecken, die wohl einer sauren Aminosäure und

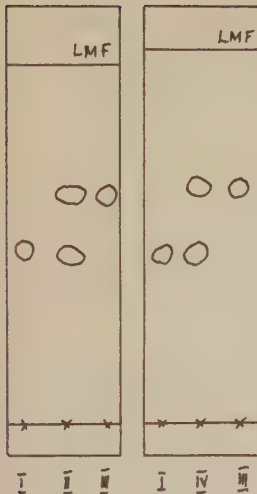


Abb. 13a und 13b

Endgruppenbestimmung am Peptid
 $N_{VI/V}$ (DNP-Methode) vor und nach
Einwirkung von Kollagenase.

Identifizierung von DNP-Glycin.

Laufmittel: iso-Amylalkohol:Pyridin:Wasser =
28 : 25 : 21

Papier: Schleicher-Schüll 2043b,
pH 6 gepuffert

aufgetragen je 10 μ (=1/20) der
organischen Phase

I DNP-Gly

II DNP- $N_{VI/V}$ (vor Kollagenase-
Abbau)

III DNP-OH

IV DNP- $N_{VI/V}$ (nach Kollagenase-
Abbau)



Abb. 14

Endgruppenbestimmung am 1. Rest-
peptid von $N_{VI/V}$ (DNP-Methode)
nach Edman-Abbau.

Identifizierung von Prolin; Hy-
droxyprolin unsicher; dritter
Fleck einer sauren Aminosäure
zugehörig.

Versuchsdaten wie bei Abb. 13a
und 13b

I DNP-Hypro

II DNP-OH

III DNP- $N_{VI/V}$ (1. Restpeptid
nach Edman-Abbau)

IV DNP-Pro

Glycin zugeordnet werden können (Abb. 14). Bei letzterem kann es sich kaum um das im R_F -Wert gleiche DNP-Hydroxyprolin handeln, denn nach der Rückspaltung der Phenylthiohydantidine zu den Aminosäuren trat Hydroxyprolin nicht auf (Versuch 8d). Da die Cyclisierungen bei diesem Edman-Abbau wegen der geringen Substanzmenge in größerer Verdünnung als gewöhnlich durchgeführt wurden, war wohl die Abspaltung des Phenylthiohydantoin-Glycins beim ersten Abbauschritt unvollständig und Glycin wurde bei der Wiederholung des Edman-Abbaus in zweiter Stufe erneut gefunden. S c h r o e d e r ⁷³⁾ berichtet ebenfalls über unvollständige Abspaltungen bei der Streifenmethodik des Verfahrens.

Mit diesem Versuchsergebnis wurde erneut die aminoendständige Sequenz Gly-Pro nach Kollagenaseabbau bestätigt. Auf den ersten Blick war aber schwer verständlich, weshalb in einem Peptid aus dem Neutralbereich des Kollagens mit 65 Aminosäuren, davon 5 Mol Prolin, nur eine kollagenasespaltbare Bindung vorhanden sein soll; theoretisch wären doch 4 möglich. Da rund 74 % des gesamten Prolins in kollagenasespaltbaren Sequenzen untergebracht sind (Tab. XIII), sollten es aus Wahrscheinlichkeitsgründen wenigstens 3 sein. Auf diese scheinbare Diskrepanz wird in der Diskussion in Zusammenhang mit anderen Ergebnissen noch näher eingegangen werden (Vgl. S. 68).

3) Partielle Zerstörung der Neutralbereiche des Kollagens durch Kollagenase

In den oben beschriebenen Versuchen war ein Angriff von Kollagenase auf neutrale Sequenzen des Kollagens gesichert worden. Andererseits weiß man, daß gegerbtes kollagenes Material für proteolytische Enzyme unangreifbar ⁷⁹⁾ ist. Es sollte aber möglich sein, durch Gerben des Materials mit Chemikalien, die nur

mit den polaren Gruppierungen des Kollagens reagieren, sowie anschließende Kollagenase-Einwirkung einen Angriff dieses Enzyms auf die allein ungegerbt gebliebenen, neutralen Bezirke des Kollagens zu erzielen. Diese Aufgabe wurde elektronenmikroskopisch bearbeitet. Weiterhin könnte durch leichtes Angerben mit Chromsalzen, die vor allem mit den sauren Seitenketten reagieren, ein Kollagen erhalten werden, dessen neutrale Bereiche einem Kollagenaseangriff noch zugänglich sind. Ein positiver Befund wäre ein erneuter Beweis für die Existenz von Bezirken mit mehr polarem und solchen mit mehr apolarem Charakter im Kollagen. Diese zweite Fragestellung wurde chemisch untersucht.

a) Elektronenmikroskopische Versuche*

K ü h n war es durch systematische chemische Veränderungen der Seitenketten des Kollagens gelungen zu zeigen, daß das Fixierungsmittel Phosphorwolframsäure (PWS) mit den freien basischen Gruppen des Kollagens und das auch industriell als Gerbmittel verwendete Chrom sowie Uranylsalze mit den sauren Seitenketten der Faser reagieren^{15b}). Die Fixierung der polaren Faserbereiche mit den genannten Substanzen bot sich also für die vorliegende Problemstellung an.

Vorversuche über die Einwirkung von Kollagenase auf Kollagenfibrillen, die mit PWS und UO_2^{++} behandelt worden waren, zeigten eine deutliche Kontrastverschärfung der elektronenmikroskopischen Querstreifung gegenüber Blindproben. Das berechtigte zur Vermutung, daß die Hellteile durch Kollagenase verdaut werden, die Dunkelteile dagegen unangegriffen bleiben.

Nun gibt aber das elektronenmikroskopische Bild der normalen Faser, wie schon auf Seite 4 erklärt, den wirklichen Aufbau des 2800 Å langen Tropokollagenmoleküls nicht richtig wieder. In den folgenden Experimenten wurde deshalb mit den in der Elektronenmikroskopie bewährten großperiodischen SLS ("segmented long spacing collagen") gearbeitet: s. Versuch 9a.

*Herrn Priv.Doiz.Dr.K. K ü h n , Heidelberg, danke ich für die gute Zusammenarbeit bei diesen Untersuchungen.

Elektronenmikroskopische Aufnahmen nach kurzer Einwirkung von Kollagenase auf mit PWS fixierte Kollagensegmente (Versuch 9b) zeigen charakteristische Veränderungen gegenüber unbehandelten Proben: Vor allem in der Mitte der SLS, die auch normalerweise schon kontrastarm sind, ist nach einer Minute eine weitere starke Aufhellung zu beobachten (Abb. 15, 16a, 16b^{*}). Das wird an länger behandelten Segmenten noch viel deutlicher, wo nur mehr die stark basischen, also auch am stärksten fixierten Endstreifen^{15d)} übrigbleiben (Abb. 17).

Mit den Hellstreifen verschwinden nach und nach die in den Mittelteilen schwachen Dunkelstreifen. Da sie sehr schmal sind, und ihnen nach der Zerstörung der Struktur von der Mitte her der Zusammenhalt mit den Nachbarbereichen fehlt, werden sie vermutlich beim Waschen der Blenden fortgespült. Die breiten Endstreifen dagegen haben eine größere Masseneinlagerung und sind fest auf der Blende fixiert. Auch ist natürlich nicht ausgeschlossen, daß die kollagenase-spaltbare Sequenz Gly-Pro-R in den Dunkelteilen des Moleküls nicht völlig fehlt.

Diese Versuche mit PWS-behandelten SLS sprechen also ebenfalls für die schon bekannte Tatsache^{15b)}, daß in der Mitte des Tropo-kollagenmoleküls bedeutend weniger basische Aminosäuren eingebaut sind als an den Enden. Bei den sauren Aminosäuren kann man aber von einer gleichmäßigeren Verteilung sprechen^{15b)}, vgl. Abb. 20.

Demnach ist also bei zusätzlicher Behandlung der Segmente mit UO_2^{++} (Versuch 9c) die Fixierung nicht nur stärker, sondern, vom ganzen Molekül her gesehen, auch durchgreifender. Dem entspricht, daß eine Verdauung mit Kollagenase hier sehr viel langsamer vor sich geht (ähnlich wie nach Gerbung mit Chromsalzen, vgl. u.). Auch nach 10 Minuten Kollagenaseeinwirkung kann kein den obigen Versuchen vergleichbarer Effekt gefunden werden, dagegen wiederum eine sehr starke Kontrastverschärfung von Hell- und Dunkelteilen (Abb. 18, 19), was wohl mit einer teilweisen Verdauung der hellen Bereiche gedeutet werden darf.

*Diese elektronenmikroskopischen Aufnahmen (Abb. 15-19) sind identisch mit den Abb. 2-7 in der Arbeit "Aminosäuresequenzen des Kollagens IV" in Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem., Band 326

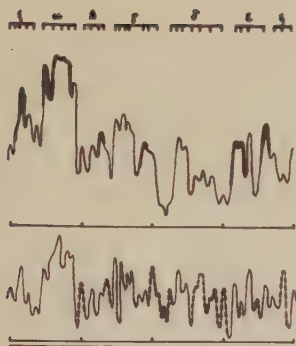


Abb. 20

Verteilung der sauren und basischen Aminosäuren in den SLS

stark ausgezogen: Anhäufungen von basischen Aminosäuren

gestrichelt: Anhäufungen von sauren Aminosäuren

(Zur Verfügung gestellt von K. Kühn und E. Zimmer, Heidelberg)

b) Partielle Chromgerbung, Kollagenaseabbau und nachfolgende Aminosäureanalyse

Die folgenden Versuche stellen das chemische Gegenstück zu den unter a) geschilderten Befunden dar. Hier wurde Kollagen partiell gegerbt, mit Kollagenase behandelt und anschließend mit dem Ausgangsmaterial durch die quantitative Aminosäureanalyse verglichen.

Im Gegensatz zu den Versuchen mit Phosphorwolframsäure, in denen die basischen Bereiche des Kollagens gegerbt und damit einem Enzymangriff entzogen wurden, wurden jetzt die sauren Aminosäuren des Kollagens mit Chrom behandelt.

Ausgangsmaterial war reines Rinder-Achillessehnen-Kollagen. Es wurde mit steigenden Mengen basischer Chromsalze gegerbt* und der proteolytischen Verdauung durch rohe, ammoniumsulfat-fraktionierte Kollagenase ausgesetzt (Versuch 10). Die in Lösung ge-

*Für seine freundliche Hilfe beim Chromgerben bin ich dem Gerbermeister unseres Instituts, Herrn F. v. d. C r o n e sehr dankbar.

gangenen Mengen sind in Tabelle V zusammengefaßt.

Man ersieht daraus, daß Kollagen durch Gerbung mit 19,6 Gew.% Chromalaun, das sind umgerechnet 2 Gew.% Chrom, für Kollagenase unangreifbar wird. Bei Anwendung einer geringeren Menge Gerbmittel bleibt eine mehr oder weniger große Kollagenase-Angreifbarkeit erhalten. Es lohnt sich also nur, schwächer angegerbtes Material zu untersuchen.

Abb. 21 zeigt an einer Charge, die nur mit 0,6 % Chrom gegerbt ist, daß man durch die Chrombehandlung der Faser nicht einen bestimmten absoluten Abbaugrad durch Kollagenase-Verdauung erzielen kann. Bei längerer Inkubation gehen vielmehr steigende Mengen Eiweiß in Lösung. Der Abbau verläuft dabei im untersuchten Bereich in Abhängigkeit von der Inkubationszeit etwa linear. Die Abbaugeschwindigkeit ist gegenüber unbehandeltem Kollagen etwa auf ein Viertel herabgesetzt.

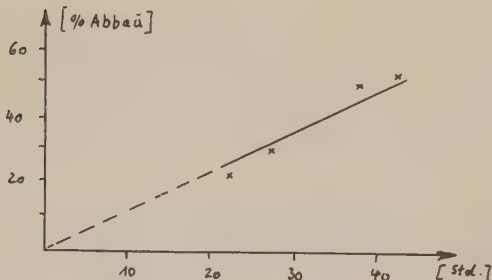


Abb. 21

Kollagenase-Abbau einer Kollagenprobe, die mit etwa 0,6 % Chrom gegerbt ist (Substanzen B und E der Tabelle V, S. 43).

Die Rückstände wurden gewaschen, getrocknet und mit KCN entchromt. Sie waren anschließend praktisch chromfrei. Von den an den abgebauten Kollagenproben erhaltenen analytischen Werten sollen an dieser Stelle die für die Problemstellung allein wichtigen Aminosäureanalysen erwähnt werden: Tab. VI. Im nächsten Kapitel werde

Tabelle V: Abbau von teilgegerbtem und nativem Kollagen durch Kollagenase

Enzym: Substrat = 1:20. Inkubiert in 3 ml Phosphat-Puffer (pH = 7,4) bei 37°.
Versuche A - J = Achillessehnen-Kollagen
Versuch K = Rinderhaut-Kollagen

Substanz	eingelagertes Chrom (Gew. %)	Chrom	Einwaage (mg)	Inkubationszeit (Std.)	Gelöst (mg)	Gelöst (%)
A	0,2		48,54	14	38,09	78,6
B ₁	0,6		52,46	22	12,02	22,9
2	0,6		50,82	37,5	25,22	49,6
C	1,0		47,55	22	5,49	11,5
D ₁	0,4		99,52	27	84,56	85,0
2	0,4		99,86	42	92,07	92,2
E ₁	0,6		100,92	27	30,47	30,1
2	0,6		99,48	42	52,55	53,0
F ₁	0,8		99,08	27	23,52	23,7
2	0,8		99,78	42	47,61	47,7
G ₁	1,0		50,34	22	9,76	19,4
2	1,0		99,71	42	29,98	30,0
H	2,0		98,55	42	2,92	3,0
K	-		3275,0	24	3196,0	97,6
J ₁	(Blindversuche ohne Kollagenase)		104,39	42	1,63	1,6
2			98,80	42	0,02	0,02

Tabelle VI: Aminosäureanalysen von teilgegerbtem und mit Kollagenase abgebautem Achillessehnenkollagen, sowie von einem Rückstand, der bei Abbau von nativem Kollagen hinterbleibt. (Bezeichnung der Substanzen wie in Tab. V. Die Zahlen geben Mol % Aminosäuren an)

Aminosäuren	Nativ. Achill. sehnenkollag.	G ₁ (19,4% Abbau)	B ₁ (22,9 % Abbau)	B ₂ (49,6 % Abbau)	A (78,4 % Abbau)	D ₂ (92,2 % Abbau) Achillessehnenkollagen	K (97,6 % Abbau; ungegerbt)
Asp Glu	4,80 7,14	4,40 7,35	4,22 6,85	4,95 7,00	4,59 7,12	9,93 11,90	4,93 7,38
Gly Ala	33,65 9,78	31,81 10,50	34,04 9,56	33,42 10,48	33,23 10,37	19,50 6,05	31,40 9,77
Ser	2,95	3,29	4,24	2,56	3,61	4,90	3,94
Thr	1,89	1,74	1,82	1,76	1,65	4,32	2,18
Tyr	0,48	0,45	0,43	0,52	0,46	1,46	0,58
Val	2,12	2,06	2,05	2,25	2,16	3,59	2,53
Met	0,36	0,18	0,10	0,16	-	0,79	0,20
Ileu	1,45	1,35	0,94	1,27	1,29	3,62	1,93
Leu	2,73	2,28	2,36	2,63	2,56	5,00	2,71
Phe	1,53	1,46	1,16	1,44	1,45	2,17	1,39
Pro	14,42	15,08	14,10	14,70	13,90	10,10	14,15
Hypro	8,34	9,25	9,91	7,85	8,55	4,50	7,70
His	0,65	0,58	0,43	0,63	0,69	1,69	0,88
Lys	2,24	2,77	2,09	2,17	2,24	4,63	2,61
Hylys	0,93	0,70	0,97	0,82	1,14	1,45	0,69
Arg	4,54	4,75	4,71	5,09	4,99	4,40	4,90

ich aber auf diese Untersuchungen in anderem Zusammenhang noch zurückzukommen haben (S. 49 ff.).

Als für die angeschnittene Fragestellung wichtiges Ergebnis sei hier festgehalten, daß sich eine signifikante Veränderung der Aminosäurezusammensetzung der Rückstände erst bei sehr starkem, nämlich etwa 95%-igem Abbau des Kollagens feststellen läßt. Die Analysen dieser Reste wiesen beträchtlich niedrigere Anteile an Glycin, Prolin und Alanin auf, also den Aminosäuren, die schon in den vorausgegangenen Versuchen als in unmittelbarer Nähe der kollagenasespaltbaren Bindungen stehend erkannt worden waren. Asparaginsäure und Glutaminsäure sind angereichert, was zu erwarten ist, weil ja die ω -Carboxylgruppen Chromsalze binden; dadurch werden die Bereiche mit Monoaminodicarbonsäuren gegerbt und widerstandsfähig gegenüber Kollagenase. Die Anteile aller übrigen Aminosäuren mit Ausnahme von Hydroxyprolin und Arginin zeigen eine unterschiedlich starke Zunahme gegenüber den Ausgangswerten, damit andeutend, daß sie entweder wenig oder gar nicht in Bereichen anzutreffen sind, wo die Kollagenase angreift oder sich in der Nachbarschaft von sauren Aminosäuren befinden.

Praktisch unverändert ist der Gehalt der Rückstände nach weitgehendem Kollagenaseabbau an Arginin. Verglichen mit der relativen Zunahme der meisten anderen Aminosäuren bedeutet dies vergleichsweise eine ins Gewicht fallende Entfernung von Argininresten beim enzymatischen Abbau. Wie bereits aus elektronenmikroskopischen Untersuchungen von Kühn hervorgeht, liegen im Kollagen Bereiche vor, in denen Arginin angehäuft ist. Diese werden von Chromsalzen nicht stabilisiert und bleiben enzymatisch angreifbar. Es soll darauf hingewiesen werden, daß in den vorliegenden Versuchen wegen Materialmangel nur Rohkollagenase zur Anwendung kam, welche von Proteasen und Peptidasen nicht befreit war. Möglicherweise haben letztere die argininhaltigen Bereiche des Kollagens etwas angegriffen.

Außerordentlich überraschend und zunächst mit unseren früheren Befunden unvereinbar scheint der Befund, daß Hydroxyprolin in den

Rückständen zu einem erheblich niedrigeren Anteil gefunden wird. Dieses Ergebnis sollte bedeuten, daß auch Hydroxyprolin in den kollagenasespaltbaren Bereichen des Kollagens vorkommt. Nachdem aber eine Analyse der aminoendständigen Sequenz eines Kollagenasehydrolysates nur die Folgen Gly-Pro-Gly und Gly-Pro-Ala ergeben hatte (s.oben), bleibt nur mehr die Carboxylseite der spaltbaren Bindungen, um dort Hydroxyprolin unterzubringen.

Daneben ist auch eine andere Deutung möglich. Logan und Mitarb.⁷⁷⁾ haben nach einem Abbau von Kollagen mit Roh-Kollagenase Gly-Pro-Hypro in vergleichsweise sehr großer Menge isoliert. Von Rohkollagenase, die in den vorliegenden Versuchen ebenfalls zur Anwendung kam, scheinen also auch hydroxyprolinhaltige Bezirke des Kollagens angegriffen zu werden.

Die vorliegenden Versuche haben mikroskopisch und makroskopisch noch einmal unter Beweis gestellt, daß im natürlichen Substrat der Kollagenase die neutralen Anteile den Ort des Angriffs für das Enzym darstellen. Indirekt wurde erneut ein Aufbau des Kollagens aus apolaren und polaren, gleichbedeutend mit geordneten und wenig geordneten Bereichen bewiesen.

III. Untersuchungen zur Bedeutung der Neutralzucker im Kollagen

In der Einleitung ist schon gesagt worden, daß der geringe Prozentsatz der Neutralzucker im Kollagen ein echter Bestandteil der Faser ist. Das Kollagen ist also folgerichtig als Glycoproteid anzusprechen. Bis vor kurzer Zeit war aber unklar, in welcher Weise die Hexosen-Komponente beim Bau der Kollagenfaser mitwirkt.

Die Ergebnisse des folgenden Abschnitts sind ein Teil neuerer experimenteller Belege für eine gut fundierte Deutungsmöglichkeit dieses Problems⁸⁰⁾.

1. Totalabbau von Rinderhautkollagen mit Kollagenase

Vorversuche hatten ergeben, daß Inkubation von Kollagen mit Kollagenase nicht zu einem hundertprozentigen Abbau des Substrats führt. Stets werden nur etwa 96 - 97 % des Kollagens verdaut.

Dieser Umstand wurde ausgenützt, um an einem solchen Abbaurückstand chemische Untersuchungen auszuführen. Nach Art des Versuchs 10c wurde Rinderhautkollagen mit Rohkollagenase (Enzym:Substrat = 1 : 100) abgebaut, der unverdaute Anteil abzentrifugiert, gewaschen und getrocknet. Er betrug 2,4 % der Einwaage und wird bei der folgenden Schilderung der quantitativen Analysen als Substanz K bezeichnet.

Die Aminosäurezusammensetzung ist auch quantitativ nur wenig verschieden von der des nativen Kollagens (Tab. VI). Der Prozentsatz an Kjeldahl-N ist gegenüber dem Ausgangsmaterial stark zurückgegangen, der Gehalt an Hexosen dagegen um ein Mehrfaches gestiegen (Tab. VII, Abb. 23; Analysenmethoden wie Versuche 10f und 10g). Das wird besonders augenfällig, wenn man die gefundenen Mengen Kjeldahl-N zu denen der Hexosen ins Verhältnis setzt (Tab. VII). Der Quotient fällt stark ab, d.h. der relative Zuckeranteil des Glycoproteids ist stark angewachsen. Aminosucker sind in K noch 0,07 % vorhanden, also bedeutend weniger als in nativer Substanz (0,2 - 0,5 %). Sie werden offensichtlich nicht angereichert.

Ferner wurde versucht, aus den Analysenwerten eine Bilanz bezüglich des Kjeldahlstickstoffs und der Hexosen zu ziehen. Tab. VII zeigt, daß sie für den Stickstoff zu 94,5 %, für die Hexosen zu 103 % aufgeht.

Tabelle VII: Bilanz des Kjeldahl-N und der Hexosen in Hautkollagen vor und nach Kollagenaseabbau

Enzymwirkung: 24 Stdn. in 40 ml Phosphatpuffer, pH 7,4; Enzym : Substrat = 1 : 100
Einwaage zum Abbau: 3,275 g; Rückwaage: 78,8 mg
Bestimmung der Hexosen: Anthronmethode⁸¹⁾.

	Kjeldahl-N		Hexosen		$\frac{\text{mg N}}{\text{mg Hexosen}}$
	%	mg	%	mg	
Rinderhaut-Kollagen	17,5	574	0,5	16,40	32 : 1
Abbaulösung	16,6	535	0,44	14,05	38 : 1
Abbaurückstand	14,2	5,6	3,61	2,85	1,96 : 1
		<u>540,6</u>		<u>16,90</u>	

Das Absorptionsspektrum des Rückstandes nach Anthron-Anfärbung entspricht den Spektren der Anthronreaktion von Glucose, Galactose, Mannose und Fucose, den bisher bekannten Hexosekomponenten des Kollagens. Vom Maximum bei 625 m μ aus gesehen ergibt sich aber kein gleichmäßiger Abfall nach kürzeren Wellenlängen hin, sondern eine Schulter bei etwa 520 m μ (s. Abb. 22). Dieser Befund stützt ein von K l e n k⁸²⁾ erhaltenes Ergebnis, der eine Reihe weiterer indirekter Beweise für das Vorkommen eines bisher unentdeckten Zuckers in Kollagen führen konnte. Die 2-Desoxyglucose absorbiert maximal bei 520 m μ , und bei einem Mischungsverhältnis Glucose : 2-Desoxyglucose = 2 : 1 resultiert ein Kurvenverlauf (Abb. 22), der dem gefundenen sehr nahe kommt. Die eigentliche Identifizierung der 2-Desoxyglucose am Papierchro-

matogramm ist aber wegen der Labilität des Zuckers noch nicht durchgeführt worden.

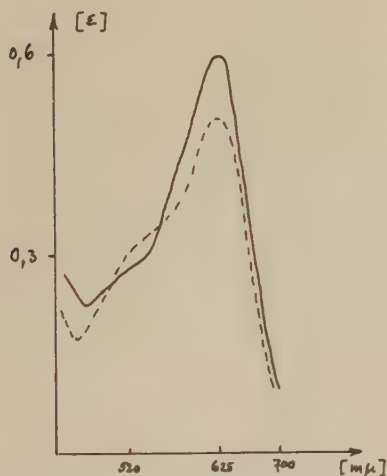


Abb. 22

Gegenüberstellung der Absorptionsspektren eines Kollagenrückstandes nach Kollagenaseabbau und eines Gemisches Glucose : 2-Desoxyglucose = 2 : 1, jeweils nach Umsetzung mit Anthron.

2. Partielle Chromgerbung und nachfolgender Kollagenaseabbau

Hierüber ist das Wichtigste schon im vorhergehenden Abschnitt gesagt worden (s.S. 41 ff.) Eine - in Bezug auf vollständige Gerbung - unterschüssige Menge Chrom wurde in Achillessehnenkollagen eingelagert, wodurch ein verlangsamter und damit ein partieller Abbau des Materials möglich wurde.

In Tab. VIII ist der Stickstoff- und Hexosengehalt von Rückständen aus teilweise chromgegerbtem Kollagen nach Kollagenaseabbau zusammengestellt. Nach dem in Abschnitt 1 Gesagten war es nicht mehr überraschend, daß der Stickstoffgehalt der Rückstände bei höherem Abbaugrad abnahm, der Hexosengehalt dagegen deutlich anstieg (Tab. VIII, Abb. 23). Das an unbehandeltem Rinderhautkollagen erhaltene Ergebnis fügt sich dabei gut in dieses Bild ein.

Tabelle VIII: Hexosen- und Stickstoffgehalt einiger in Tab. VI genannten Substanzen

Angaben in Gew.%; vgl. Abb. 23

Substanz	Abbaugrad (%)	Hexosen	Stickstoff
Achillessehnenkollagen	----	0,46	17,0
H	3,0	0,61	17,1
B ₁	22,9	0,98	
F ₁	23,7	0,77	16,6
E ₁	30,0	0,64	
G ₂	30,0	0,61	16,2
F ₂	47,7	0,94	15,8
B ₂	49,6	0,86	
E ₂	53,0	0,97	15,95
A	78,4	1,82	
D ₁	85,0	1,94	
Rinderhautkollagen	----	0,50	17,5
K	97,5	3,61	14,2

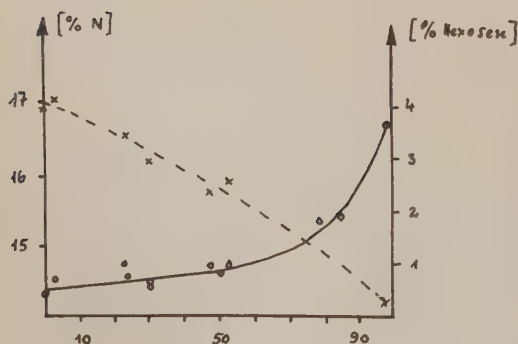


Abb. 23

Veränderung des Kjeldahl-N und der Hexosen bei teilgegerbtem und kollagenase-abgebautem Kollagen (vgl. obige Tabelle)

3. Partielle Denaturierung und nachfolgender Trypsinabbau

Eine Kohlenhydratanreicherung in Kollagen konnte noch ein drittes Mal verifiziert werden.

Durch Variierung der Bedingungen der Hitzedenaturierung gelingt es nach Angaben von G r a ß m a n n , Kollagen partiell zu denaturieren⁸³⁾ und damit einem Angriff durch Trypsin teilweise zugänglich zu machen. Man kann sich das wohl so erklären, daß bestimmte verbrückte Stellen im Kollagen (s. Einleitung) im Gegensatz zum Hauptanteil unverändert, nativ bleiben und infolgedessen auch bei einer anschließenden Trypsinbehandlung ungelöst zurückbleiben (Abb. 24). Eine Untersuchung des Rückstandes müßte Rückschlüsse auf die Natur dieser vernetzenden Komponenten erlauben.

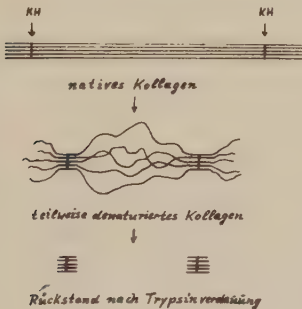


Abb. 24

(entnommen⁸⁰⁾)

Schema zur teilweisen Denaturierung von Kollagen und nachfolgendem Trypsinabbau. (KH = Quervernetzung durch Kohlenhydrate.)

Da die Einheitlichkeit des Materials für eine gleichmäßige Denaturierung von großer Bedeutung ist, wurden aus Rinderhautkollagen die besonders feinfaserigen Anteile ausgelesen. Jeweils 1,5 - 2 g wurden den in Tab. IX genannten Denaturierungsbedingungen unterworfen und nach Versuch 11 mit Trypsin abgebaut. Nach 48 und 78 Stunden wurde das Inkubationsmilieu gewechselt und das Enzym in gleicher Menge erneuert. Der überwiegende Anteil

Tabelle IX: Teildenaturierung und Trypsinabbau von Rinderhautkollegen.

(Abbaugrad in %)

Probe Nr.	Denaturierungsbedingungen	Einwaage	abgebaut nach 48 Std.	abgebaut nach 78 Std.	abgebaut nach 100 Std.
1	8,5' bei 56°	1,52 g	22,4	28,3	
2	10' bei 58,5°	1,93 g	49,2	54,9	59,9
3	10' bei 58,5°	1,86 g	48,4	54,8	
4	10' bei 60°	1,98 g	76,8	80,8	

Tabelle X: Quantitative Aminosäurezusammensetzung von partiell denaturiertem und tryptisch abgebautem Kollagen. (Die Zahlen geben Mol % Aminosäuren an)

Aminosäuren	Natives Rinderaut-Kollagen	Probe Nr. 1 (28,3 % Abbau)	Probe N r. 2 (54,9 % Abbau)	Probe Nr. 3 (54,8 % Abbau)	Probe Nr. 4 (80,8 % Abbau)
Asp	4,61	4,26	4,34	3,29	4,62
Glu	7,55	6,76	6,94	6,62	7,94
Gly	31,82	35,00	33,78	33,36	30,85
Ala	10,38	10,48	10,63	10,42	11,50
Ser	3,25	2,88	2,90	3,30	3,98
Thr	1,86	1,89	1,84	1,77	1,85
Tyr	0,29	0,31	0,28	0,35	0,42
Val	2,10	2,05	1,97	1,84	1,36
Met	0,45	0,37	0,37	0,25	0,18
Ileu	1,74	1,48	1,44	1,27	1,43
Leu	2,33	2,15	1,99	2,16	2,11
Phe	1,55	1,11	1,37	1,36	1,28
Pro	13,79	13,93	13,50	12,90	14,10
Hypro	8,55	8,55	8,45	10,80	10,15
His	0,52	0,63	0,22	0,58	0,41
Lys	2,90	1,85	4,16	3,10	2,53
Hylys	0,67	0,83	0,77	1,01	0,77
Arg	5,48	5,24	5,05	5,62	4,52

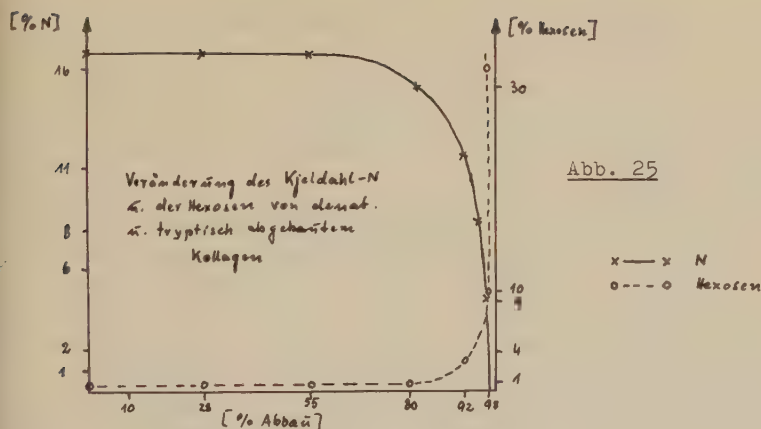
an Eiweiß war jedoch trotz des auf diese Weise steigenden Enzym:Substrat-Verhältnisses schon in den ersten 48 Stunden verdaut worden.

Tabelle XI: Hexosen- und Stickstoffgehalt von partiell denaturiertem und tryptisch abgebautem Kollagen. (Angaben in Gew.%)

Substanz	Abbaugrad (%)	Hexosen	Stickstoff
Natives Rinderhaut-Kollagen	----	0,54	16,8
Probe Nr. 1	28,3	0,58	16,65
Probe Nr. 2	54,9	0,52	16,6
Probe Nr. 3	54,8	0,60	16,6
Probe Nr. 4	80,8	0,84	15,0

Während ähnlich wie beim Kollagenaseabbau die Aminosäurezusammensetzung der Rückstände keine wirkliche Veränderung gegenüber dem nativen Ausgangsmaterial erkennen läßt (Tab. X), kann man Tab. XI und der entsprechenden graphischen Darstellung, Abb. 25, wiederum ein gegenläufiges Verhalten von Stickstoff- und Hexosengehalt in den Rückständen bei steigendem Abbaugrad entnehmen. Die Versuchsdaten sind in der Abb. 25 durch Werte ergänzt, die mir von H. H ö r m a n n dankenswerterweise für eine abrundende Darstellung zur Verfügung gestellt wurden.

Der Stickstoffgehalt sinkt auch hier zunächst langsam und schnell erst im Bereich eines etwa 95 %-igen Abbaus; die Zunahme der Hexosen im Kollagen wird überhaupt erst bei 80 % Abbau deutlich und steigt allerdings dann sehr rasch an.



Bei dieser Versuchsreihe muß aber grundsätzlich eines zu bedenken gegeben werden: Die partielle Denaturierung verläuft bei dem komplizierten Material vermutlich nicht einheitlich. Es liegt auf der Hand, daß dünne Fasern leichter denaturieren als dickere, so daß also damit gerechnet werden muß, daß mit einem nicht gleichmäßig abgebauten Kollagen als Rückstand gearbeitet werden mußte. Im Extremfall könnte also eine Teildena-
turierung dadurch vorgetäuscht werden, daß völlig native und völlig denaturierte Fasern in einem bestimmten Mischungsver-
hältnis vorliegen. Dazu kommt, daß sich auch die Probenahme schwierig gestaltet, weil nach der Trocknung des abgebauten Kollagens das Material teils in Form intakter Fasern, teils als pulveriger, mengenmäßig zurücktretender Abbaurückstand an-
fällt. Es muß deshalb mit der Möglichkeit gerechnet werden, daß im wesentlichen nichtabgebaute Fasern zur Untersuchung kamen, was die über einen weiten Abbaubereich nahezu gleich bleibenden Analysenwerte erklären könnte.

C. Diskussion der Ergebnisse

I. Die heute gültige Vorstellung von der Spezifität der Kollagenase

Die im Abschnitt B II beschriebenen Versuche haben zu einer genaueren Kenntnis der Kollagenasespezifität beigetragen. Aus der Tatsache, daß ich die Peptide Hypro-Gly-Gly-Pro, Pro-Gly-Gly-Pro und Cbo-Pro-Gly-Gly-Pro (s. Tabellen II und XII) als unspaltbar fand, obwohl ihre Sequenzen an sich der von Noda und Heyns aufgestellten Spezifitätsregel Pro-R-Gly-Pro gehorchten, schloß ich, daß von Kollagenase Peptide dieser Sequenz nur dann angegriffen werden, wenn ihre beiden Endgruppen substituiert sind. Das würde den Verhältnissen am natürlichen Substrat Kollagen entsprechen, wo die fraglichen Peptidbereiche ja auch in lange Proteinketten eingebaut sind. Diese Hypothese wurde auch bestätigt.

In den vorhergehenden Arbeiten waren lediglich prolinhaltige Substrate untersucht worden. Die vorliegenden Untersuchungen haben zusätzlich gezeigt, daß Prolin prinzipiell durch Hydroxyprolin ersetzt sein kann. Schon Heyns und Legler⁶³⁾ hatten die Vermutung ausgesprochen, daß das der Fall sein könnte. Sie folgerten das aus ihren Ergebnissen an Knochenkollagen. Hier wurden nach Kollagenase-Einwirkung N-endständig 156 Mol Glycin/10⁵ g Kollagen, entsprechend 15,4 Mol Glycin/100 Mol Aminosäuren gefunden. Da im Kollagen aber insgesamt nur etwa 13 Mol Prolin/100 Mol Aminosäuren vorhanden sind, andererseits die Spezifität der Kollagenase stark ausgeprägt ist, schlossen die Autoren auf diese naheliegende Möglichkeit. Unsere eigenen Versuche haben allerdings einen erheblich niedrigeren Wert, nämlich 12,6 bis 13 Mol Glycin/100 Mol Aminosäuren für das N-terminale Glycin ergeben (vgl. S. 29 und Tab. IIIb).

In Tab. XII, S. 57, sind alle mit synthetischen Substraten erarbeiteten Ergebnisse nochmals zusammengefaßt.

Als Resultat aller dieser Befunde wurde von Graßmann,

Tabelle XII: Kollagenasespaltbare und verwandte Peptide

Peptide, deren Sequenz der Spezifitätsregel gehorcht:

Noda u. Mitarb. (1959) ⁶²⁾	Gly-Pro-Leu↓Gly-Pro-NH ₂
Heyns u. Mitarb. (1959) ⁶³⁾	Cbo-Pro-Ala↓Gly-Pro-NH ₂
Grassmann u. Mitarb. (1959) ⁵³⁾	Cbo-Hypro-Gly↓Gly-Pro-OCH ₃
Noda u. Mitarb. (1960) ⁷⁴⁾	Cbo-Pro-Leu↓Gly-Pro
	DNP-Pro-Leu↓Gly-Pro
	Gly-Pro-Leu↓Gly-Pro
	Gly-Pro-Leu↓Gly-Hypro
	Cbo-Gly-Pro-Leu↓Gly-Pro
Grassmann u. Mitarb. (1960) ⁵⁷⁾	Cbo-Gly-Pro-Gly↓Gly-Pro-Ala
Heyns u. Mitarb. (1960) ⁹⁹⁾	Cbo-Pro-Pro↓Gly-Pro-NH ₂
	Cbo-Pro-Glu↓Gly-Pro-NH ₂
	Cbo-Pro-Arg↓Gly-Pro-NH ₂
	Cbo-Pro-Ala↓Gly-Hypro-NH ₂
	Cbo-Pro-Gly↓Gly-Pro-NH ₂

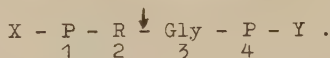
Spaltbare Peptide ähnlicher Sequenz:

Heyns u. Mitarb. (1959) ⁶³⁾	Cbo-Ala↓Gly-Pro-NH ₂
Noda u. Mitarb. (1960) ⁷⁴⁾	Cbo-Leu↓Gly-Pro-NH ₂
	Gly-Pro-Leu↓Gly-Gly-Pro
Heyns u. Mitarb. (1960) ⁹⁹⁾	Cbo-Pro-Ala↓Ala-Pro-NH ₂
	Cbo-Ala↓Gly-Hypro-NH ₂

Nichtspaltbare Peptide ähnlicher Sequenz:

Grassmann u. Mitarb. (1959) ⁵³⁾	Pro-Gly-Gly-Pro
	Hypro-Gly-Gly-Pro
	Cbo-Pro-Gly-Gly-Pro
	Cbo-Gly-Gly-Pro-OCH ₃
	Cbo-Gly-Gly-Hypro-OCH ₃
Heyns u. Mitarb. (1959) ⁶³⁾	Cbo-Gly-Gly-Pro-NH ₂
	Cbo-Pro-Ala-Gly-NH ₂
Noda u. Mitarb. (1960) ⁷⁴⁾	Pro-Leu-Gly-Pro
	Gly-Pro-Leu-Leu-Pro
	Gly-Pro-Gly-Leu-Pro

H ö r m a n n , N o r d w i g u n d W ü n s c h ⁵³⁾ die Spezifitätsregel für den Kollagenaseangriff wie folgt formuliert:



Wobei bedeuten P Prolin oder Hydroxyprolin, R eine Aminosäure, X und Y Aminoacylreste oder Schutzgruppen.

Ein Ergebnis dieser Arbeit, die Spaltung von Cbo-Hypro-Gly[↓]Gly-Pro-OCH₃ wurde durch Befunde von N o d a ⁶²⁾ und H e y n s ⁹⁹⁾ erweitert, die Gly-Pro-Leu[↓]Gly-Hypro bzw. Cbo-Pro-Ala[↓]Gly-Hypro-NH₂ mit Kollagenase hydrolysieren konnten. Es können also grundsätzlich beide Prolinreste in einem Kollagenasesubstrat durch Hydroxyprolin ersetzt sein. Ob das freilich zu gleicher Zeit der Fall sein kann, die Sequenz also auch Hypro-R-Gly-Hypro lauten darf, ist noch nicht untersucht worden.

Die Schutzfunktion X für den Iminostickstoff des Prolins in Position 1 muß sicher vorhanden sein. Das darf man aus den erwähnten eigenen Ergebnissen, ferner aus der Arbeit von N o d a ⁷⁴⁾ schließen, der Pro-Leu-Gly-Pro mit Kollagenase nicht spalten konnte. In jüngster Zeit zeigte H e y n s ⁹⁹⁾ sogar, daß Substrate mit fehlendem X, also mit freier Prolin-Iminogruppe, als Inhibitoren für Kollagenase wirken.

Nicht so sicher dagegen ist, ob Y stets vorhanden sein muß. N o d a bestätigte zwar die Nichtspaltbarkeit von Cbo-Pro-Gly-Gly-Pro, konnte aber seinerseits mit Kollagenase eine Anzahl von Peptiden hydrolysieren, die eine freie Prolin-Carboxylgruppe trugen, allerdings in Position R stets Leucin statt Glycin hatten ⁷⁴⁾. Nun ist aber die Leucyl-Bindung stets besonders leicht enzymatisch spaltbar. G r a B m a n n und Mitarb. ⁸⁴⁾ haben nachgewiesen, daß die Affinität der Dipeptidasen aus Hefe und Niere gegenüber Glycyl-, Alanyl- und Leucylpeptiden im Verhältnis von Zehnerpotenzen ansteigt und die Spaltungsgeschwindigkeit im gleichen Sinne verläuft. Ähnliche Ergebnisse sind für das Enzym Amino-peptidase erhalten worden ¹⁰⁰⁾. So könnte man also auch Nodas Ergebnisse

verstehen, desgleichen die Tatsache, daß die Japaner Gly-Pro-Leu↓Gly-Gly-Pro spalten konnten, obwohl hier offensichtlich die Spezifitätsregel nicht eingehalten wird; zwischen den beiden Iminosäuren finden sich drei statt zwei Aminosäuren.

Der Aminosäurerest R in Stellung 2 läßt wenig Spezifitätsansprüche erkennen. Die Spaltung synthetischer Peptide zeigt, daß R Glycin, Alanin oder Leucin sein kann (Tab. XII); auch Prolin, Glutaminsäure und Arginin in Position R verhindern die Spaltung nicht, wie eine neuere Arbeit von H e y n s ⁹⁹⁾ nachweist. Glycin in Position 3 ist sehr spezifisch und darf allenfalls gegen Alanin ausgetauscht werden; H e y n s ⁹⁹⁾ berichtet über die langsame Hydrolyse von Cbo-Pro-Ala↓Ala-Pro-NH₂, während N o d a ⁷⁴⁾ Gly-Pro-Leu-Leu-Pro als unspaltbar beschreibt.

Was kann man hinsichtlich der Kollagenase-Spezifität aus den Untersuchungen an Kollagenpeptiden schließen, die durch Verdauung mit Kollagenase entstanden sind? Der Rest R müßte hier zugleich die C-terminale Aminosäure sein, wenn man in den Neutralteilen eine ständige Wiederholung der Folge Gly-Pro-R annimmt, wodurch sich ja die kollagenaseempfindlichen Sequenzen Gly-Pro-R-Gly-Pro-R usw. ergeben würden. G a l l o p ⁶⁰⁾ und auch H e y n s ⁶³⁾ haben die Summe der C-endständigen Reste untersucht und dabei fast alle Aminosäuren gefunden, darunter auch Glycin, Prolin und Hydroxyprolin.

Aus meinen Versuchen an Cbo-Hypro-Gly↓Gly-Pro-OCH₃ und Cbo-Gly-Pro-Gly↓Gly-Pro-Ala war hervorgegangen, daß R grundsätzlich auch Glycin sein kann. Auch die Natur macht beim Aufbau des Kollagens überraschend häufig von der Sequenz Gly-Pro-Gly Gebrauch (S. 31). Von den erwähnten Bearbeitern wurden auch Alanin, desgleichen die mit meinen Ergebnissen nicht sicher beweisbaren Serin, Threonin, Valin, Methionin, Isoleucin, Phenylalanin, Hydroxyprolin und Glutaminsäure carboxylendständig gefunden.

Glycin in Stellung 3 schließlich scheint auch nach den Spaltungsversuchen an Kollagen die Regel zu sein. Die nach meinen Versuchen

auch möglichen Alanin, Glutaminsäure und Asparaginsäure findet man nur zu einem so geringen Prozentsatz am N-Ende der Spaltungsstelle, daß die Ursache wohl eher geringen Verunreinigungen des Enzympräparates zuzuschreiben ist. Der von M a n d l ⁶⁵⁾ angegebene Wert von 10 % N-endständigem Alanin nach Kollagenasespaltung findet in meinen Ergebnissen keine Stütze.

Die Frage der Ersatzbarkeit von Prolin durch Hydroxyprolin im Falle des natürlichen Substrats Kollagen wird in anderem Zusammenhang diskutiert (S. 66).

Die auf S. 58 angegebene Spezifitätsregel hat sich also auch für das Kollagen selbst bewährt. Ausnahmen von dieser Regel sind bisher nur sehr wenige bekannt. Außer dem schon erwähnten Gly-Pro-Leu-Gly-Gly-Pro sind bisher nur noch Cbo-Ala-Gly-Pro-NH₂ ⁶³⁾ und Cbo-Leu-Gly-Pro-NH₂ ⁷⁴⁾ als unspezifisch gespaltene Substrate beschrieben worden, bei deren Inkubation mit Kollagenase in beiden Fällen Gly-Pro-NH₂ entsteht. Alle drei Verbindungen werden nach N o d a bedeutend langsamer gespalten als die eigentlichen Kollagenasesubstrate. Da aber die Autoren beider Mitteilungen mit Versuchsbeschreibungen und experimentellen Daten sehr geizen, läßt sich schwer abschätzen, mit wie reinen Enzympräparaten gearbeitet wurde. In meiner eigenen Versuchsreihe waren gleichfalls Peptide dieser Anordnung untersucht worden, nämlich Cbo-Gly-Gly-Pro-OCH₃ und das entsprechende Hydroxyprolinpeptid (Tab. XII). In beiden Fällen konnte weder in Phosphat- noch in Trispuffer eine Spaltung beobachtet werden. H e y n s ⁶³⁾ beschrieb Cbo-Gly-Gly-Pro-NH₂ gleichfalls als unangreifbar für Kollagenase. Freilich ist auch denkbar, daß eine Spaltung dieser Glycyl-Peptide, die im oben diskutierten Sinne wesentlich langsamer verlaufen sollte als die der Alanin- und Leucinderivate, aus eben diesem Grunde übersehen wurde. Kinetische Vergleichsmessungen müßten hier Aufschluß geben.

Die Nebenspezifität des anderen Typs (Gly-Pro-Leu[↓]Gly-Gly-Pro) könnte das Auftreten anderer Aminosäuren nach dem zweiten Edman-Schritt an Stelle von Prolin erklären. Ist nämlich eine Spaltung von -Pro-R[↓]Gly-Z-Pro- auch an natürlichen Substraten möglich, würde so das Auftreten von Alanin, Serin, Leucin und Glutaminsäure

als Aminosäure Z verständlich. Allerdings müßte dann nach dem dritten Edman-Schritt mehr Prolin gefunden werden, als das dann tatsächlich der Fall ist.

II. Bedeutung der Abbauergebnisse für die Primärstruktur des Kollagens ¹⁰¹⁾

Folgende Punkte der vorliegenden Arbeit leisten wichtige Beiträge für diese Problemstellung (vgl. dazu die Tabellen III und IV sowie die zusammenfassende Tabelle XIII):

1) Die Sequenz Gly-Pro-R macht zusammen mindestens 42 % aller Aminosäuren des Kollagens aus. Ungefähr 25 % entfallen auf die Folge Gly-Pro-Gly-, ca. 6 % auf Gly-Pro-Ala, der Rest auf Peptide, wo R wenig Spezifität erkennen läßt.

Diese Häufung von Glycin paßt gut zu der Tatsache, daß es andererseits unter den kürzerkettigen tryptischen Spaltprodukten des Kollagens Peptide gibt, wo nur jede vierte oder fünfte Aminosäure Glycin ist³¹⁾. Bei langkettigen Bruchstücken dagegen macht das Glycin wie im Kollagen selbst praktisch immer rund 1/3 der Gesamtaminosäuren aus³¹⁾.

2) Die Sequenz Gly-Pro als vermutlich wesentlichstes Bauelement der Kollagenfaser bestreitet allein mindestens 22 - 24 % aller Aminosäuren des Kollagens. Hydroxyprolin kann dabei Prolin nicht ersetzen.

3) Ca. 67 % des insgesamt vorhandenen Glycins und etwa 74 % allen Prolins werden in diesen Sequenzen erfaßt und sind damit in ihrer Bindungsweise bekannt. Zählt man zu dieser Prolinmenge noch den von Logan⁷⁷⁾ gefundenen Anteil für Gly-Pro-Hydroxyprolin hinzu, der etwa 20 % ausmacht, dann kann man praktisch über das gesamte vorhandene Prolin Aussagen machen: Prolin ist im Kollagen an kleine neutrale Aminosäuren gebunden und kommt fast ausschließlich in

Tabelle XIII: Anteil der bei den einzelnen Abbauschritten abgespaltenen Aminosäuren von den Gesamtaminosäuren des Prokollagens bzw. der Substanz Q

	Mol Aminosr./100 Mol Aminosr. Substanz Q		% von der Gesamtmenge der betreff. Aminosr. in Substanz Q			
	Prokollagen	Substanz Q	Gly	Pro	Ala	Gly
Glycin						
1. Abbauschritt	13,00	11,90	40,9			38,2
2. Abbauschritt	<u>8,28</u>		<u>26,0</u>			
Summe	21,28		66,9			
Prolin						
2. Abbauschritt	10,90	11,74		74,4		70,2
Alanin						
1. Abbauschritt		1,10			22,6	10,6
2. Abbauschritt	2,39	1,34			<u>19,2</u>	12,9
3. Abbauschritt	<u>2,09</u>				42,5	
Summe	4,38	<u>2,44</u>				<u>23,5</u>
H-Gly-Pro-OH	21,8	23,48	33,3	74,4		37,8*
H-Gly-Pro-Gly-OH *	24,8		52,1	56,6		70,2**
H-Gly-Pro-Ala-OH *	6,3		6,6	14,3	19,9	

*Bei der Berechnung dieser Zahlen wurde angenommen, daß das gesamte in dritter Position gefundene Glycin in der Sequenz Gly-Pro-Gly, die gesamte Menge Alanin in dritter Position in der Folge Gly-Pro-Ala vorliegt

**Der mögliche, geringe Anteil von Ala-Pro ist hierbei vernachlässigt.

Form der Sequenzen Gly-Pro-Gly-, Gly-Pro-Ala und Gly-Pro-Hypro vor.

Über Bedeutung und Bindungsweise des Hydroxyprolins, der für Kollagen charakteristischen Aminosäure, sagen diese Ergebnisse nichts aus. Diese Fragen erscheinen deswegen in erhöhtem Maße klärungsbedürftig.

4) Die Befunde sichern einen Angriff der Kollagenase auf Neutralteile des Kollagens und damit einen Aufbau der Faser aus einerseits vorwiegend apolaren und andererseits stark polaren Bereichen.

Was letztere Frage betrifft, sprechen außer den schon erwähnten Arbeiten von Kühn¹⁵⁾, der Anhäufungen von Glutaminsäure und Asparaginsäure sowie von basischen Aminosäuren feststellte und sie bestimmten Querstreifungen des elektronenmikroskopischen Bildes zuordnen konnte, auch die tryptischen Spaltprodukte des Frokollagens für eine solche Annahme^{13, 31)}. Stets verhält sich nämlich der Gehalt dieser Peptide an polaren Aminosäuren gegenläufig zu der Menge der vorhandenen Iminosäuren Prolin und Hydroxyprolin. Außerdem läßt sich am Peptid S_F zeigen, daß in dem 44 Aminosäuren langen Bruchstück drei der vier vorhandenen sauren Aminosäuren gehäuft am Carboxylende vorkommen.

Gleiche Schlüsse darf man aus den vorliegenden Befunden ziehen. Der weitaus überwiegende Teil der bei den verschiedenen Abbau-schritten abgespaltenen Aminosäuren entfällt auf apolare Bausteine. Das wäre nicht denkbar, wenn man nicht zugleich auch Bereiche mit überwiegenden Anteilen von sauren und basischen Aminosäuren annehmen würde. Die Versuche mit den teilgegerbten Materialien weisen in die gleiche Richtung. Im Elektronenmikroskop konnte darüber hinaus eine rasche Verdauung der Hellteile mit Kollagenase beobachtet werden¹⁰²⁾.

Was ist bisher über die Feinstruktur der Hellteile der Faser bekannt gewesen? Bergmann war der erste, der eine regelmäßige Wiederkehr bestimmter Aminosäurefolgen im Kollagen für möglich hielt⁸⁵⁾. Diese Vorstellung, Ausgangspunkt und Teil der später allgemeiner gefaßten Theorien, die einen von periodischen

heute bewiesen, daß schon wegen der erwähnten Anhäufungen der polaren Gruppierungen in der Faser^{13, 15, 31)} keine kontinuierlichen Dreierperioden möglich sind. Aus diesen und anderen Gründen wurde die B e r g m a n n ' sche Spekulation der Dreierbausteine in der Folgezeit wieder fallen gelassen.

In den Laboratorien von S c h r o e d e r⁷⁵⁾ und K r o n e r⁷⁶⁾ waren nämlich aus Kollagen und Gelatine mit Säuren und Alkalien Peptide isoliert worden, die mit diesen Vorstellungen nicht harmonierten. Einige von ihnen sind in Tab. XIV genannt.

Man sieht aus der Tabelle aber auch, daß eine ganze Reihe von Peptiden gefunden worden ist, die als Dreierperioden im Sinne B e r g m a n n s aufgefaßt werden oder ihnen doch entstammen können. Besonders die großen Anteile von Gly-Pro und Hypro-Gly fallen ins Auge. Wesentlich erscheint ferner die Tatsache, daß trotz dieser großen Zahl von Peptiden niemals mit Sicherheit eine Verknüpfung Gly-Hypro nachgewiesen werden konnte. Bei der Beurteilung der beschriebenen Versuche in quantitativer Hinsicht ist zu bedenken, daß die Ausbeuten an rein isolierten Peptiden durchwegs sehr gering sind, was beim unspezifischen, "statistischen" Charakter der partiellen Säurehydrolyse und den Schwierigkeiten der chromatographischen Aufarbeitung nicht verwundern kann.

Dieses Bedenken entfällt bei enzymatischen Spaltungen. L o g a n und Mitarb.⁷⁷⁾ verwendeten methanolgefällte, also nur unvollkommen gereinigte Kollagenase zu ihren Untersuchungen. Nach Trennung der entstandenen Peptide an Ionenaustauschern konnten sie zwei Tripeptide, nämlich Gly-Pro-Ala und Gly-Pro-Hypro rein isolieren. Die Berechnung ergab, daß sie damit 14 % des gesamten Glycins, je 23 % des Alanins und Hydroxyprolins und 2 x 20 % des gesamten Prolins im Kollagen erfaßt hatten.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden ohne die Schwierigkeiten einer Trennung des enzymatisch gewonnenen Peptidgemisches erhalten. Sie zeigen trotz einer gewissen Fehlerbreite bei der Ausrechnung, daß die Anteile des in der fraglichen Bindung vor-

liegenden Glycins und Prolins sehr viel höher sind, als in den von L o g a n isolierten Peptiden. Der Anteil des Alanins an dieser Sequenz beträgt nach meinen Bestimmungen, übereinstimmend mit denen von L o g a n, etwa 20 % vom Gesamtgehalt der Aminosäuren; Hydroxyprolin dagegen konnte von mir nur in geringeren Mengen (etwa 7 % des gesamten Hypro) gefunden werden. Die Möglichkeit, daß Hydroxyprolin beim Edman-Abbau anomal reagiert, ist aber auf jeden Fall auszuschließen. Ein Kontrollversuch mit synthetischem Hypro-Gly ergab eine 100%ige Abspaltung der Iminosäure bei gleichartiger Behandlung wie beim Abbau des Prokollagenhydrolysats.

Diese Diskrepanz hinsichtlich des Hydroxyprolins kann man wohl mit der verschiedenen Beschaffenheit der Enzympräparate erklären. Während die von L o g a n verwendete Rohkollagenase auch Enzyme zu enthalten scheint, welche die Sequenz Gly-Fro-Hypro freisetzen können, ist das reine Enzym offenbar dazu nicht in der Lage. Das stünde in Einklang mit den eigenen Befunden bei Verwendung von Rohpräparaten, wo gleichfalls, im Gegensatz zu allen übrigen Versuchen, viel Hydroxyprolin abgespalten wurde (vgl. S. 45).

Damit ist aber über die Hauptmenge des Hydroxyprolins, der für Kollagene "charakteristischen", weil nur in ihnen vorkommenden Aminosäure und seine Rolle beim Aufbau der Struktur keine Klarheit erhalten worden. Nur ein kleinerer Anteil wurde bisher erfaßt, denn die Sequenz Gly-Pro-Hypro existiert ganz sicher. Das geht außer aus den Ergebnissen von K r o n e r ⁷⁶⁾ (vgl. Tab. XIV) vor allem aus den einwandfreien Arbeiten von L o g a n ⁷⁷⁾ hervor, der 20 % von der Gesamtmenge des Hydroxyprolins in der Sequenz Gly-Fro-Hypro wiederfindet.

Weil nun aber nur noch eine kleine Menge des Prolins für eine solche Sequenz zur Verfügung steht (vgl. Tab. XIII), läßt sich hier auch nur ein relativ kleiner Teil des Hydroxyprolins unterbringen. Deswegen liegt die Annahme nahe, daß die kristallinen Bereiche der Kollagenfaser nicht streng nach der Dreierregel von B e r g m a n n bzw. R i c h und C r i c k aufgebaut sind, sondern daß sie von Sequenzen der Art

a) -R-Hydro-Gly-R'-Pro-R''-

und/oder

b) -Pro-R-R'-R''-Gly-Pro-Hydro-Gly-R'''-

unterbrochen werden, wobei R, R' und R'' nicht Pro oder Hydro sind.

Alle bisher gefundenen Hydroxyprolinpeptide des Kollagens würden sich zwanglos in ein solches Bild einfügen (Tab. XIV). Diese Möglichkeiten würden ferner einem von S c h r o e d e r ⁷⁵⁾ diskutierten und von K r o n e r ⁷⁶⁾ in geringen Mengen auch gefundenen Strukturelement Gly-(Pro,Hydro)-Gly nicht widersprechen. Die Sequenz Gly-Pro-Hydro von L o g a n ⁷⁷⁾ paßt sich ebenfalls ein. Schließlich tragen diese Vorschläge der Tatsache Rechnung, daß die Bindung Gly-Hydro im Kollagen bisher nicht gefunden werden konnte, Hydro-Gly- dagegen häufig.

Vermutlich ist Hydroxyprolin aber auch recht oft aminoseitig mit einer Base verknüpft, was R = Arginin oder Lysin in der Sequenz a) bedeuten würde. Etwa 40 % aller im Kollagen vorhandenen Basenverknüpfungen sind auf der Carboxylseite durch Trypsin nicht spaltbar. Dabei dürfte es sich um Bindungen an Iminosäuren handeln, deren Unspaltbarkeit durch Trypsin mit exakten Messungen an entsprechenden synthetischen Peptiden bewiesen werden konnte ⁸⁸⁾. Nun ist aber, wie oben ausgeführt wurde, das Prolin des Kollagens bereits für eine andere Bindungsweise vergeben. Also kann für eine Sequenz Base-Iminosäure allein das Hydroxyprolin in Frage kommen. Es läßt sich berechnen, daß etwa ein Drittel des insgesamt vorhandenen Hydroxyprolins in einer solchen Bindungsweise vorliegen muß. Vielleicht handelt es sich hierbei sogar um den Übergang der polaren Bereiche zu den apolaren.

Für die Annahme von H e y n s ⁶³⁾, der Hydroxyprolin im Kollagen anstelle des Prolins gewissermaßen als dessen Ersatz untergebracht wissen will (vgl. S. 56), gibt es in meinen wie in allen bisherigen in der Literatur beschriebenen Ergebnissen keinen Anhaltspunkt. Der von ihm angegebene Anteil von 156 Mol N-terminalem Glycin/10⁵ g Kollagen nach Kollagenasespaltung ist sicherlich zu hoch. Nach unseren eigenen Messungen bewegt er sich um 124 Mol

Glycin/ 10^5 g Prokollagen, berechnet auf Grund der verlässlichen Aminosäureanalysen. Die vorhandene Menge Prolin (137 Mol) reicht also ohne weiteres für die Sequenz Gly-Pro in der gefundenen Menge aus.

Der allein im Kollagen vorkommenden Aminosäure Hydroxyprolin muß man also nach meinen Ergebnissen eine strukturelle Sonderstellung zuschreiben. Man muß annehmen, daß sie in mehreren vermuteten, vorläufig aber noch unbewiesenen Bindungsformen auftritt, anders als das Prolin, das offenbar nur in Form von Gly-Pro vorliegt und so sicherlich eine außerordentlich wichtige Rolle bei der Ausbildung der Kollagenstruktur spielt.

Die am Peptid $N_{VI/V}$ erhaltenen Ergebnisse passen gut in das entwickelte Bild. Die Befunde von Schleyer^{30,31}, quantitative N- und C-Endgruppenbestimmungen in Kombination mit dem aus der quantitativen Aminosäureanalyse abgeleiteten Mindestmolekulargewicht, machen für dieses Peptid, ebenso wie für zahlreiche andere neutrale und saure Spaltstücke des Prokollagens eine mehrspiralige, ~~meist~~ dreikettige Anordnung sehr wahrscheinlich.

Das Peptid $N_{VI/V}$, das aus insgesamt 65 Aminosäuren besteht, enthält u.a. 5 Prolin, 4 Hydroxyprolin, 4 Lysin und 1 Arginin; 2 Lysin und das Arginin sind carboxylendständig, 3 Glycin aminoendständig. Bei Einwirkung von Kollagenase auf dieses Peptid wurde eine Aufspaltung in 2 Bruchstücke beobachtet (Abb. 12, S. 36), ferner eine Verdoppelung des N-terminalen Glycins (S. 36). Das bedeutet aber bei einer dreifädigen Anordnung drei Spaltstellen, wobei jede Spaltung gemäß den Regeln der Kollagenase-Spezifität zwei Iminosäuren verlangt. Da aber nur 5 Prolin vorhanden sind, muß in wenigstens einer Peptidkette ein Hydroxyprolin in einer für Kollagenase spaltbaren Bindung vorliegen! Das könnte man sich mit einer Anordnung der Art a) ($R' = \text{Gly}$) gut vorstellen. Die verbleibenden Hydroxyprolinreste liegen wohl am Lysin gebunden vor. Nur drei der insgesamt fünf Basen sind ja C-endständig.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bestätigen die vermutete Sequenz Gly-Pro-R: Alle Befunde sind mit dem im wesentlichen aus

Röntgenstrukturdaten abgeleiteten Modell der geordneten Bereiche von R i c h und C r i c k (vgl. S. 1 f.) vereinbar und sie dürfen wohl als die bisher weitgehendste chemische Stütze dieses Modells betrachtet werden. Sie deuten allerdings darauf hin, daß innerhalb der geordneten Bereiche der Kollagenfaser keine strenge Periodizität, sondern auch hier eine gewisse Variabilität herrscht. Neben den kristallinen Anteilen, die durch die Dreierperiode Gly-Pro-R, insbesondere durch einen unerwartet hohen Anteil von Gly-Pro-Gly repräsentiert werden, dürfte es auch Aminosäuresequenzen geben, die weniger regelmäßig sind - was gut in das Bild vom Kollagen als schwer zu charakterisierendes Material passen würde.

III. Neutralzucker und Quervernetzungen im reifen Kollagen!

In der Einleitung ist das Wichtigste zum Verhältnis Prokollagen-Kollagen schon gesagt worden. Danach verhalten sich beide Materialien in vieler Hinsicht übereinstimmend und unterscheiden sich nur in ihrem Lösungsverhalten: Kollagen ist völlig unlöslich, Prokollagen dagegen ist in sauren Medien oder in Gegenwart wasserstoffbrücken-sprengender Reagenzien gut löslich und durch Dialyse wieder in Faserform ausfällbar.

Meine Befunde, wonach sich bei unvollständigem Abbau von Kollagen mit Kollagenase und Trypsin Kohlenhydrate anreichern, deuten darauf hin, daß reifes Kollagen sich von Prokollagen durch Zucker-Quervernetzungen unterscheidet.

Die Vorstellungen von S c h n e i d e r ⁸⁹⁾ über die Art des Einbaus der Zucker in die Kollagenketten sind unbewiesen und hypothetisch geblieben. Erst in letzter Zeit gelang es H ö r m a n n ⁸⁰⁾ auf Grund der eingehenden Untersuchungen mit K l e n k ⁸²⁾ und der beschriebenen eigenen Ergebnisse, diese Annahmen experimentell

zu fundieren und damit weitgehend wahrscheinlich zu machen¹⁰³⁾.

Im Schema 24, Seite 51 ist schon angedeutet, wie man mit einer solchen Erklärungsmöglichkeit die gemachten Befunde für den Fall der partiell denaturierten Kollagene verstehen könnte. Bei einer bestimmten einwirkenden Wärmeenergie werden vernetzte Stellen der Faser einer Denaturierung im Gegenstz zu den durch Wärme leicht anregbaren übrigen Teilen widerstehen können. Sie bleiben also nativ und sind damit einem Trypsinabbau nicht zugänglich; so kommen die kohlenhydratreichen Rückstände zustande. Die Aminosäureanalysen zeigen, daß es sich dabei noch um wirklich kollagenes Material handelt. Dementsprechend muß der prozentuale Anteil an Kjeldahl-Stickstoff sinken, was auch gefunden wird. Ein ähnliches Ergebnis erhält man bei der Verdauung von partiell denaturiertem Kollagen mit Elastase⁹⁰⁾.

Auffallend ist nun, wie verschieden stark die Zunahme an Kohlenhydrat bei Behandlung mit Trypsin bzw. Kollagenase ist: Bei einer 97,5%igen tryptischen Verdauung beträgt der Zuckeranteil im Rückstand ca. 25 %, im Fall eines Abbaus mit Kollagenase erst 3,6 %. Die Anreicherung ist im ersteren Fall 58fach, im letzteren nur 7fach. Da Trypsin in den mehr polaren, Kollagenase in den mehr neutralen Bereichen der Kollagenfaser angreift, muß an eine Lage der verbrückten Stellen in der Nähe der letzteren, also in den Hellteilen der Fibrille gedacht werden. Auch elektronenmikroskopische Aufnahmen deuten darauf hin¹⁰⁴⁾.

Genauere Vorstellungen über die Natur der Zucker-Quervernetzungen im Kollagen haben sich aus den Ergebnissen von K l e n k⁸²⁾ ergeben. Anknüpfend an frühere, in unserem Institut ausgeführte Arbeiten, wurde dort das Verhalten von Kollagen und Prokollagen bei Einwirkung von Perjodat und Hydroxylamin in Gegenwart von H-Brücken-Sprengern untersucht.

Als perjodatempfindliche Gruppierungen kommen außer den Zuckern nur noch Hydroxylysin und Tyrosin in Frage; als quervernetzende Moleküle sind sie aber nicht vorstellbar, denn durch Substitution

der funktionellen Gruppe ihrer Seitenketten würden sie gleichzeitig ihre Oxydierbarkeit durch Perjodat verlieren.

Daß Esterbindungen keine Fiktion sind, zeigen neben älteren Befunden ^{91 - 93)} vor allem die Versuche mit Hydroxylamin⁸²⁾; dabei werden in Kollagen etwa doppelt so viel NH_2OH -empfindliche Bindungen gefunden wie im Prokollagen. Das paßt gut in die entwickelte Vorstellung: Intermolekulare Querverbindungen in Prokollagen sind wegen seiner Löslichkeit in sauren Medien gar nicht wahrscheinlich. Man muß hier vielmehr intramolekulare Bindungen innerhalb einer Dreierspirale annehmen. Im Kollagen dagegen kommen noch intermolekulare Vernetzungen mehrerer Dreierspiralen dazu (Ansteigen des Anteils der Esterverbindungen), die das Eiweiß unlöslich machen. Hydroxylamin in Gegenwart von Wasserstoffbrücken-Sprengern löst diese Valenzen und damit das Kollagen auf.

Was die glykosidischen Bindungen angeht, ist wenig wahrscheinlich, daß dafür N-glykosidische Gruppierungen in Frage kommen⁹⁴⁾. Dafür spricht mit einiger Wahrscheinlichkeit, daß die Kohlenhydrate des Kollagens mit Phenylhydrazin keine Osazone bilden, was übrigens auch gegen freie reduzierende Gruppen spricht. Es bleiben also die O-glykosidischen Verknüpfungen mit den Hydroxylgruppen der Seitenketten des Kollagens. Da nach obigen Folgerungen (Seite 70) die Quervernetzungen besonders in den Neutralteilen der Faser zu suchen sind, ist diese Rolle wohl den OH-Gruppen des Serins, Tyrosins, Threonins oder Hydroxyprolins zuzuschreiben.

D. Experimenteller Teil

Versuch 1

Durchführung der quantitativen Aktivitätsbestimmung für Kollagenase

Heterogener Suspensionstest, basierend auf der Mikrostickstoff-Bestimmung nach Nessler-Winkler:

Man benötigt für die Bestimmung:

Selenreaktions-Gemisch, Kjeldahl-Schwefelsäure (mit 15 % P_2O_5), 20%-ige NaOH

Nessler-Winkler-Reagenz: 10 g rotes Quecksilberjodid und 8 g Kaliumjodid in 100 ml 20%-iger NaOH lösen, nach kräftigem Schütteln durch ein Glasfilter abnutschen.

Puffer: Man löst 31,2 g $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ und 35,6 g $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ in je 1 Ltr. destilliertem Wasser. Durch Mischen von 19 Teilen der ersten mit 81 Teilen der zweiten Lösung erhält man einen 0,2 molaren Puffer vom pH 7,4.

Prokollagensuspension: ca. 420 mg trockenes Prokollagen (Darstellung nach l.c.¹⁸⁾) werden in 100 ml eben geschmolzenem dest. Wasser 30 Sek. homogenisiert (Apparat der Firma Bühler, Reutlingen). Gehaltsbestimmung der Suspension nach Kjeldahl. Die Konzentration von 4 mg pro ml muß genau eingestellt werden.

In trockene Zentrifugengläser pipettiert man 2 ml Prokollagensuspension ein und stellt 5 min in den Thermostaten bei 37° zum Temperatúrausgleich. Dann gibt man zu den Blindproben 0,5 ml Puffer, zum Test 0,5 ml des im gleichen Puffer gelösten Enzyms zu und inkubiert 20 min lang. Alle Minuten wird mit einem Glasstab kräftig umgerührt. Am Ende der Inkubation werden die Proben rasch durch ein weiches Filter in ein Reagenzglas filtriert.

Noch während der Inkubation hat man die Aufschlußgläser vorberei-

tet (auf 5 und 10 ml geeichte Reagenzgläser). Jedes Glas wird mit 1-2 mg Selenreaktionsgemisch und 0,1 ml Kjeldahl-Schwefelsäure beschickt. Zur Untersuchung werden nun für jede Probe, einschließlich der Blindprobe 0,1 ml des Filtrats abpipettiert und im elektrisch beheizten Spezialgerät aufgeschlossen. Der Aufschluß ist dann beendet, wenn die sich rasch braun färbende Flüssigkeit wasserhell geworden ist.

Man läßt abkühlen, versetzt jedes Glas mit 5 ml bidestilliertem Wasser und 0,5 ml 20%-iger NaOH, verschließt mit einer Plastikfolie und schüttelt gut durch. Sodann wird mit bidestilliertem Wasser bis zur 10 ml-Marke aufgefüllt, mit 0,5 ml Nessler-Winkler-Reagenz versetzt und erneut kräftig umgeschüttelt. Nach 30 min wird im Beckman-Spektralphotometer, Modell B, bei 405 m μ gegen einen Null-Wert gemessen, der nur die verwendeten Reagenzien enthält. Der Blindwert der Inkubation (Substrat ohne Enzym) wird von den jeweiligen Meßwerten abgezogen.

Zur Eichung werden in ein peinlich sauberes 20 ml Meßkölbchen 94,2 mg getrocknetes Ammonsulfat p.A. eingewogen. Füllt man bis zur Marke mit bidestilliertem Wasser auf, enthält die Lösung 1000 γ N pro ml. Die Werte mit und ohne Aufschluß stimmen sehr gut überein (Abb. 1, S. 12).

Anmerkung: Besonders wenn die Aufschlußgläser schon häufig benutzt wurden, bildet sich beim Aufschluß ein weißer, verschieden stark verteilter Niederschlag, der wahrscheinlich von den Elementen des Glases herrühren dürfte. wenige große Flocken setzen sich rasch ab und stören die optische Messung nicht, ein feiner Niederschlag dagegen erhöht die Extinktion bisweilen beträchtlich. Es empfiehlt sich in solchen Fällen, nach dem Auffüllen auf die 10 ml-Marke zu zentrifugieren. Diese Methode zeigt gegenüber Kontrollen keine Minusfehler. Zentrifugieren erst nach Versetzen mit Nessler-Reagenz dagegen ist wegen großer Minus-Fehler unmöglich (Adsorption des Farbstoffs auf dem Niederschlag).

Versuch 2

Quantitativer kolorimetrischer Test auf Kollagenase⁵⁷⁾

a) Herstellung der Reagenzien:

Citratpuffer: Man löst 21,02 g Citronensäure . H_2O (0,1 Mol) und 1,58 g Calciumacetat (0,01 Mol) in etwa 500 ml dest. Wasser, gibt unter Rühren solange 1 n NaOH zu, bis ein pH von 6,3 erreicht ist (= 290 ml) und füllt auf 1 Ltr. auf.

Ninhydrinreagenz nach Moore und Stein⁵⁵⁾: 20 g Ninhydrin werden in 750 ml Methylglycol gelöst. Nach Zusatz von 0,4 g $SnCl_2 \cdot 2H_2O$ schüttelt man gut durch, versetzt mit 250 ml 4 n Acetatpuffer und überschichtet anschließend mit Paraffin. Während der ganzen Herstellung wird Stickstoff durch die Lösung geleitet.

Acetatpuffer: 1360 g Natriumacetat . $3H_2O$ in 2,25 Ltr. dest. H_2O lösen und 250 ml Eisessig zufügen.

- b) Versuchsdurchführung: Man bereitet sich eine Lösung des Cbo-Gly-Pro-Gly-Gly-Pro-Ala in Citratpuffer (Konzentration: 1,0 mg/ml). Pro Testansatz werden 2 ml verwendet, die in einem kleinen Reagensglas 5 Min. lang bei 37° zum Temperatúrausgleich in einen Thermostaten gestellt werden. Das Enzym löst man in 0,5 ml 0,01 m Calciumacetat und präinkubiert es vor dem Zussammengießen beider Lösungen gleichfalls 5 Min. bei 37° . Als Blindprobe dient ein gleichartiger enzymfreier Ansatz. Nach genau 15 Min. werden diesen Lösungen je 0,3 ml entnommen und in 0,1 ml m Trichloressigsäure einpipettiert. Man gibt 1 ml Ninhydrinreagens zu, schüttelt gut durch, kocht 20 Min. am Wasserbad, läßt abkühlen und verdünnt (mit Propanol : Wasser = 1 : 1) auf 5 ml. Messen bei 565 m μ im Spektralphotometer Beckman, Modell B, gegen die Blindprobe als Bezugswert.

Für die Eichung löst man Gly-Pro-Ala in Citratpuffer und färbt in gleicher Weise an.

Versuch 3

Untersuchung der Verdaubarkeit von Elastin durch Kollagenase

10,3 mg denaturiertes Aorta-Elastin (dargestellt nach B a n g a ⁹⁵⁾ wurden in 5 ml Natriumcarbonat/HCl-Puffer (0,05 m; pH = 8,8) 30 min. lang bei 37° mit Kollagenase unter häufigem Umrühren inkubiert; Enzym : Substrat = 1 : 10. Nach Abstoppen der Reaktion mit Alkohol, Waschen mit Wasser und Trocknen wurde rückgewogen. Es konnte keine Gewichtsabnahme festgestellt werden.

Unter sonst gleichen Bedingungen wurde dem Enzym im gleichen Puffersystem Prokollagen-Suspension angeboten. Qualitativ wurde dabei sehr kräftige Verdauung festgestellt.

Versuch 4

Versuche zur Spaltung synthetischer Peptide mit Kollagenase

a) Allgemeine Methodik:

1 mg Peptid wird in ein Zentrifugenglas (10 ml Inhalt) eingewogen. Dazu wird das Enzym pipettiert (Konzentration: 10 - 50 γ /ml Puffer) und der ganze Ansatz bei 37° inkubiert. Nach drei und sechs, bzw. 14 und 23 Stunden werden jeweils 0,03 ml zur Chromatographie entnommen, nach der jeweils längeren Inkubationszeit auch eine gleiche Menge der unter denselben Bedingungen mitgelaufenen, enzymfreien Blindprobe. Es wird aufsteigend in Butanol: Essig:Wasser = 4 : 1 : 5 chromatographiert; Papier: Schleicher & Schüll 2043b; Anfärbung mit Ninhydrin und nach Reindl-Hoppe ⁶⁴⁾.

Folgende Puffer fanden Verwendung:

Phosphatpuffer (0,2 m; pH = 7,4), s. Versuch 1;

Trispuffer (0,2 m; pH = 7,4): Eine Lösung von 24,2 g Tris-(hydroxymethyl)aminomethan in 1 l dest. H₂O mit 0,2 m HCl bis pH = 7,4 versetzen.

b) Ammonacetat als Puffermedium:

Zur Vermeidung der starken Salzflecken (R_f = 0,15 - 0,2) wurde bei

der Einwirkung von Kollagenase auf Cbo-Hypro-Gly-Gly-Pro-OCH₃ in einer Variante obiger Methodik eine schwach puffernde Ammonacetat-Lösung benutzt. Diese Substanz ist durch Gefriertrocknung leicht zu entfernen. Man löst 15,4 g Ammonacetat in einem Liter dest. Wasser. Die erhaltene Lösung hat einen pH von 6,98 und ist 0,2 molar.

1 mg Peptid wird in einem Zentrifugenglas mit 0,15 ml Puffer versetzt. Mit einem Glasstab wird versucht, das Peptid so fein als möglich zu zerreiben. Das wird nach Zugabe von 0,75 ml dest. Wasser wiederholt. Schließlich werden, in 0,1 ml Puffer gelöst, 50 μ g Kollagenase dazupipettiert und der Ansatz bei 37° inkubiert. Mit einem Tropfen stark verdünnten Ammoniaks stellt man auf pH 7,5 - 8,0 ein. Im Laufe der Reaktion wird öfter umgeschüttelt und gegebenenfalls das pH nachgestellt. Der Cbo-Peptidester geht allmählich, jedoch nicht vollständig in Lösung.

Nach 6 Stunden entnimmt man 0,4 ml; gefriertrocknet, nimmt in 0,1 ml H₂O wieder auf und trägt 0,04 ml dieser Lösung je Chromatogramm auf. Das wiederholt man nach 22 bis 24 Stunden. Die mitgelaufene Blindprobe wird ebenso getestet. Anfärbung wie bei a). Der ungelöste Rückstand wird gewaschen, getrocknet und rückgewogen.

c) Versuch zur Umwandlung von Gly-Pro-OCH₃ in das Anhydrid:

Man erhitzt 20 mg Gly-Pro in 1 ml Äthylenglykol nach Angaben von S c h o t t und Mitarb.⁹⁶⁾ 60 min. lang auf 165 - 170°. Nach Abziehen des Lösungsmittels i.V. hinterbleibt ein braunes Kristallisat, das aus Alkohol umkristallisiert werden kann. Zur Reinheitsprüfung vgl. Abb. 26.

d) Spaltung von Cbo-Gly-Pro-Gly-Gly-Pro-Ala:

In diesem Falle wurde 0,2 m Pyridin/Acetat-Puffer (pH 6,3) verwendet. Herstellung: 15 ml Pyridin, 0,3 ml Eisessig und 160 mg Calciumacetat (0,001 Mol) werden in 1 Liter des. Wasser gelöst.

10 mg Peptid in 0,9 ml Puffer lösen und mit 0,1 ml einer 0,3 %igen Lösung von Kollagenase im gleichen Puffer versetzen. Bei 37°

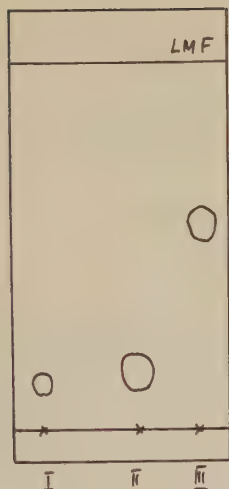


Abb. 26

Versuch zur Synthese von Glycyl-Prolyl-Anhydrid

Reinheitsprüfung und R_f -Wert-Bestimmung des nach Versuch 4c erhaltenen Produkts

Laufmittel, Papier und Anfärbung wie bei Abb. 7, S. 21

aufgetragen: 20 μ Glycin und je 50 μ Gly-Pro und Substanz X

- I Gly
- II Gly-Pro
- III Gly-Pro-Anhydrid

sechs Stunden lang inkubieren. Nach 3 und 6 Stunden je 0,03 ml der Lösung entnehmen und auf Whatman Nr. 1-Papier auftragen. Zusammen mit Gly-Pro-Ala als Vergleichssubstanz aufsteigend in Butanol:Essig:Pyridin:Wasser = 30:6:20:24 und Phenol:Wasser = 3 : 1 chromatographieren.

Versuch 5

Qualitative und quantitative Bestimmung der aminoendständigen Gruppen im Kollagen nach Spaltung mit Kollagenase.

a) Herstellung des Abbaugemisches:

100 mg Prokollagen (Darstellung nach O r e c h o w i t s c h ¹⁸⁾) in 20 ml Pyridin/Acetatpuffer (Versuch 4d) suspendieren und mit 1 mg Kollagenase bei 37° über Nacht abbauen. Zur Zerstörung des Enzyms 5 min. auf 70° erhitzen. Nach Zentrifugieren in der Kältezentrifuge gefriertrocknen. Ausbeute etwa 120 mg.

Zur Bestimmung des Eiweißgehalts des Präparats wiegt man gleiche Mengen l-Leucin und Eiweiß/Salz-Gemisch ein, hydrolisiert nach Moore und Stein⁵⁵⁾ mit 2,5 n NaOH bei 90° und färbt mit Ninhydrin an. Durch Vergleich der bei 565 m μ gemessenen Extinktionen kann man den ungefähren Eiweißgehalt der Probe errechnen.

b) DNP-Methode⁶⁶⁾:

In einem zuschmelzbaren Kölbchen 2 - 4 mg Abbaugemisch in 100 λ 1 % NaHCO₃ lösen und einen Überschuß an Dinitrofluorbenzol zugeben (0,5 %ig in Äthanol). 2 Stunden bei Zimmertemperatur schütteln. Den Alkohol i.V. entfernen und anschließend den Überschuß an DNFB mit Essigester ausschütteln. 1 - 2 ml 5,7 n HCl zugeben, das Kölbchen unter Stickstoff zuschmelzen und 8 Stunden bei 100 - 105° hydrolisieren. Anschließend mit Essigester ausschütteln und die organische Phase mit stark verdünnter Salzsäure auswaschen und i.V. eindampfen. In 100 - 300 λ Essigester aufnehmen und unter kaltem Luftstrom auf das Chromatogramm auftragen. Die wässrige Phase über P₂O₅ und KOH trocknen und getrennt chromatographieren.

Man trennt horizontal mit Pyridin:iso-Amylalkohol:Wasser = 25:28:21 als Laufmittel. Die Papiere sind dabei mit Phthalatpuffer vom pH 6 getränkt, bzw. mit Phthalatpuffer vom pH 5, wenn man auf eine gute Trennung der Asparaginsäure und Glutaminsäure Wert legt. Herstellung der Puffer: Durch Mischen von 50 ml 0,1 m Kaliumhydrogenphthalat und 45,5 ml 0,1 n NaOH und Auffüllen auf 100 ml erhält man einen Puffer vom pH 6, durch Mischen von 50 ml 0,1 m Kaliumhydrogenphthalat und 23,9 ml 0,1 n NaOH und Auffüllen auf 100 ml einen Puffer von pH 5.

Die Flecke werden ausgeschnitten und mit 4 ml 1 %igem NaHCO₃ etwa 30 Min. lang in einem Reagensglas unter gelegentlichem, vorsichtigem Schütteln eluiert. Messen bei 360 m μ gegen eine Blindprobe.

c) Messung der molaren Extinktionskoeffizienten von DNP-Amino-

säuren in 1%iger NaHCO_3 -Lösung:

Man wiegt 3 - 6 mg DNP-Aminosäuren je Liter 1%igem NaHCO_3 ein und mißt die Extinktion bei 360 mp. Nach der Gleichung

$$E_{\text{Mol}} = \frac{E}{c \cdot d} \quad \text{ergeben sich folgende Werte:}$$

DNP-Asparaginsäure	1,74 . 10^4	[l.mol ⁻¹ .cm ⁻¹]
DNP-Glutaminsäure	1,63 . 10^4	"
DNP-Glycin	1,67 . 10^4	"
DNP-Alanin	1,59 . 10^4	"

d) Bestimmung der Ausbeute bei Dinitrophenylierung von Aminosäuren mit anschließender Papierchromatographie:

Hierzu werden 1 - 2 mg der Aminosäuren eingewogen und wie unter b) beschrieben dinitrophenyliert.

Nach dem Einengen der organischen Phase löst man in 200 μ l und trägt 4 - 5 μ l auf. Papierchromatographie, Elution und Messung wie oben. Die Ausbeute ergibt sich aus dem theoretisch berechneten und dem experimentell gemessenen Wert.

Nach achtstündiger Hydrolyse in 5,7 n HCl wurden folgende Werte gefunden:

DNP-Asparaginsäure	63 %
DNP-Glutaminsäure	52 %
DNP-Glycin	42,8 %
DNP-Alanin	78 %

e) Bestimmung der prozentualen Anteile der N-terminalen Aminosäuren beim Prokollagen-Abbaugemisch:

Einwaage 1,11 mg. Man verfährt wie unter b) angegeben; nach Einengen der organischen Phase in 300 μ l Essigester lösen und 13 μ l zur Chromatographie auftragen. Nach Elution und Extinktionsmessung korrigiert man auf die molare Extinktion des DNP-Glycins als Bezugswert (c) und mit den Ausbeutefaktoren (d):

	Gemessene Extinktion (360 m μ)	Korrektur bezüglich Ausbeute	Korrektur bezügl. ϵ_{mol} des DNP-Gly	Anteil in %
Asp	0,002	0,003	0,0029	0,4
Glu	0,002	0,004	0,0041	0,6
Gly	0,269	0,672	0,6720	96,7
Ala	0,012	0,015	0,0157	2,3

Versuch 6

Schrittweiser Abbau nach E d m a n 70)

a) 50 mg des mit Kollagenase erhaltenen Abbaugemisches von Prokollagen (Versuch 5a) werden in 5 ml Wasser gelöst und mit dem gleichen Volumen Pyridin versetzt. Dann wird das pH mit verdünnter NaOH auf 8,5 - 9,0 eingestellt (gemessen mit der Glaselektrode) und 0,125 ml Phenylsenföhl zur Lösung pipettiert. Unter Konstanthaltung des pH mit verdünnter NaOH wird dann 2 Stdn. am Magnetrührer kräftig gerührt. Zweckmäßigerweise wird die ganze Reaktion in einem Zentrifugenglas durchgeführt, da nach der Umsetzung das Pyridin und überschüssiges Phenylsenföhl mit Benzol extrahiert werden müssen. Zur schnelleren Trennung der Schichten empfiehlt es sich zu zentrifugieren.

Nach fünfmaliger Extraktion mit einem jeweils gleichen Volumen Benzol wird die Umsetzung nochmals wiederholt, um eine quantitative Reaktion der aminoendständigen Aminosäuren zu gewährleisten.

Danach wird gefriergetrocknet. Die trockene Substanz wird in 2 ml Eisessig, die zwei bis drei Tropfen 5,7 n HCl enthalten, eine Stunde lang auf 40° erwärmt. Nach dieser cyclisierenden Abspaltung schüttelt man die gebildeten Thiohydantoine zweimal mit Essigester aus und gefriertrocknet die wässrige Phase, die das Restpeptid enthält, erneut.

b) Um festzustellen, ob Hydroxyprolin beim Edman- Abbau normal und quantitativ reagiert, wurden 10 mg Hypo-Gly wie unter a) mit

Phenylisothiocyanat umgesetzt und wie angegeben weiterbehandelt. In der wässrigen Phase waren bei einer anschließenden quantitativen Aminosäurebestimmung (s. Versuch 7) Glycin in großer Menge, Hydroxyprolin aber nicht einmal in Spuren nachweisbar.

Versuch 7

Quantitative Aminosäureanalyse⁷²⁾

3 - 4 mg Eiweiß werden in ein Hydrolysekölbchen genau eingewogen und mit 2 ml destillierter 5,7 n HCl versetzt. Das Kölbchen wird unter Stickstoff abgeschmolzen. Hydrolysendauer 24 Stunden bei 105°.

Dann trocknet man das Hydrolysat über P₂O₅ und KOH i.V. Den Rückstand nimmt man in 0,5 ml Citratpuffer auf (0,2 m; pH 2,2) und trägt je 0,2 ml davon auf eine Säule zur Trennung der basischen Aminosäuren (Amberlite IRC 50) und auf eine Säule zur Trennung der nichtbasischen Aminosäuren (Dowex 50X8 oder Amberlite CG 120) auf*.

Die Trennung erfolgt automatisch bei 50° durch Elution mit einem kontinuierlich von pH 3,1 auf pH 5,1 steigenden Citratpuffer-Gradienten. Auch die Auswertung der mit Ninhydrin entstehenden Anfärbungen der einzelnen Aminosäuren erfolgt automatisch mit einem Extinktionsschreiber. Zur Berechnung dient ein seiner Zusammensetzung nach vorgegebener Test.

Versuch 8

Untersuchungen am Neutralpeptid N_{VI} v

a) Abbau mit Kollagenase:

15 mg des Peptids werden mit 210 γ Reinkollagenase in 6 ml Pyriden/Acetat-Puffer (0,2 m; pH 6,8; Herstellung: Versuch 4d) inku-

* Trennapparatur n. K. H a n n i g , Hersteller: Fa. Bender & Hobein, München, Lindwurmstr. 71

biert. Vor Beginn der Reaktion sowie nach 10 und 30 Min. und nach 1,3 und 6 Stunden werden dem Ansatz 0,08 ml, entsprechend je 200 μ entnommen und auf ein Chromatogramm aufgetragen. Laufmittel ist Butanol:Pyridin:Eisessig:Wasser = 4:4:1:5. Anfärbung mit Ninhydrin. Ergebnis: Abb. 12, S. 36.

b) Dinitrophenylierung vor und nach Abbau mit Kollagenase:

Ausführung wie Versuch 4b. Organische Phase der Dinitrophenylierung in beiden Fällen in 200 λ Essigester aufgenommen und je 10 λ davon zur Chromatographie aufgetragen. Bei Berücksichtigung des Ausbeutefaktors ergibt sich:

	Einwaage mg μ Mol		Gemessene Extinktion (360 m μ)	μ Mol Gly	μ Mol Gly pro μ Mol Peptid
N _{VI/v} vor Abbau	2,48	0,425	0,113	1,35	3,18
N _{VI/v} nach Abbau	0,884	0,151	0,087	1,045	6,92

Das Verhältnis des N-terminalen Glycins in N_{VI/v} vor und nach Abbau mit Kollagenase beträgt also 2,17.

c) Edman-Abbau und Dinitropheylierung des Restpeptids nach erstem Edman-Schritt:

Wie in Versuch 6 beschrieben. Einwaage 6,96 mg. Cyclisiert nach zweimaliger Umsetzung in 5 ml Eisessig + 2 Tropfen 5,7 n HCl bei 40°.

1,78 mg des trockenen Rückstandes werden wie oben dinitrophenyliert. Hydrolyse: 2 Stunden in 5,7 n HCl bei 105°.

Das übrige Restpeptid wird erneut zweimal mit Phenylsenföl umgesetzt. Cyclisierung und weitere Behandlung wie oben.

d) Rückspaltung der Phenylthiohydantoine zu den Aminosäuren:

Die Essigesterphasen der Cyclisierung werden i.V. eingeengt und 12 Stunden in 1 ml 5,7 n HCl bei 150° hydrolysiert. Nach Abdampfen der HCl wird der Rückstand in einigen Tropfen H₂O aufgenommen und nochmals eingedampft. Chromatographieren in Butanol:Eisessig:Wasser = 4:1:5.

Versuch 9

Elektronenmikroskopische Verfolgung der Einwirkung von Kollagenase auf fixierte long-spacing-Segmente (SLS).

a) Herstellung von SLS:

Man extrahiert Kalbshaut wie bei der Herstellung von Prokollagen¹⁸⁾ mit Citratpuffer und erhält dabei eine etwa 0,2 %ige Eiweißlösung (bezogen auf Kjeldahl-N). Die Lösung wird gegen 0,05 %ige Essigsäure umdialysiert.

10 ml dieser Lösung werden mit 10 ml einer 0,4 %igen ATP-Lösung versetzt und das pH anschließend mit NaOH auf 3,5 eingestellt. Man läßt 18 - 24 Std. im Eisschrank stehen, zentrifugiert den Bodenkörper ab, der etwa 95 % des eingesetzten Stickstoffs enthält, und wäscht mit 0,2%iger ATP-Lösung einmal nach. Im Überstand ist mit Phosphorwolfram-Säure (PWS) keine Fällung mehr zu erzielen.

b) Anfärbung mit PWS:

Zu der SLS-Aufschlammung in 0,2%igem ATP (pH 3,5) wird langsam eine 0,2%ige Lösung von Phosphorwolframsäure in Wasser (pH 4,1) getropft. Man läßt über Nacht im Eisschrank stehen, zentrifugiert dann ab und wäscht mit Wasser.

c) Anfärbung mit PWS und UO₂⁺⁺:

Man färbt zunächst mit Phosphorwolframsäure (wie unter b) angegeben) an und erst dann mit einer 0,5%igen Lösung von Uranylacetat in Wasser. Umgekehrt soll nicht verfahren werden, weil UO₂⁺⁺ mit ATP einen unlöslichen Niederschlag gibt.

d) Abbauprobungen:

Man tropft eine Suspension der Kollagensegmente, die nach b) oder c) fixiert worden sind, auf eine befilmte (Formvar oder Collodium) elektronenmikroskopische Siebenschloß-Blende und läßt eintrocknen. Dann wird auf die Blende eine stark verdünnte Lösung von Rein- bzw. Rohkollagenase in Wasser aufgetropft. Abpuffern der Kollagenaselösung mit Tris-, Phosphat- oder Pyridin/Acetat-Puffern in den üblichen Konzentrationen stößt auf Schwierigkeiten, weil dadurch - wie auch Blindversuche zeigen - die Querstreifung der fixierten SLS stark in Mitleidenschaft gezogen wird. Die Phosphorwolframsäure wird bei höheren pH-Bereichen ausgewaschen.

Versuch 10

Versuche mit teilgegerbtem Kollagen

a) Herstellung von Achillessehnenkollagen:

Frische Achillessehne vom Rind wird mit einem Skalpell von Fett- und Bindegewebe befreit und im Gefrieremikrotom quer zur Faser 7,5 μ dick geschnitten. Das Vorratsgefäß enthält dabei als Antiseptikum einige Tropfen einer 0,1 %igen Thymollösung. Das feine Material wird durch gründliches Waschen mit Alkohol, Aceton und Äther in dieser Reihenfolge entwässert und entfettet. Durch anschließendes Trocknen i.V. erhält man eine rein weiße, lockere Substanz.

b) Gerbung:

250 mg - Chargen dieses Materials wurden in Wasser gut verquollen und dann mit Chromalaun-Lösungen versetzt, die mit calc. Soda auf eine Basizität von 4/12 eingestellt waren. Die Konzentrationen der Chromalaunlösungen waren dabei so berechnet, daß die in Tab. V, S. 43 angegebenen Mengen an eingelagertem Chrom, bezogen auf die Einwaage, resultierten. Zur gleichmäßigen Einlagerung des Gerbstoffs wurde nun 24 Stunden lang geschüttelt und anschließend in einer kontinuierlichen Tropfeinrichtung mit 5 ltr. destilliertem Wasser pro Charge nachgewaschen. Trocknen über P_2O_5 .

c) Inkubation mit Kollagenase:

Es wurde das durch Ammonsulfat-Fraktionierung des Kulturfiltrats von *Cl. histolyticum* gewonnene Rohräparat der Fa. Sigma Chem. Comp., St. Louis, U.S.A., benutzt. Die in Tab. V angegebenen Mengen wurden in Zentrifugengläser eingewogen und bei einem Enzym:Substrat-Verhältnis von 1:20 in insgesamt 3 ml Phosphatpuffer (Herstellung: Versuch 1) inkubiert. Man setzt 0,1 ml einer bei der Inkubationstemperatur von 37° gesättigten Thymollösung zu.

Während des Abbaus wird häufig mit einem Glasstab umgerührt. Nach Ablauf der in Tabelle V aufgeführten Zeiten wurde zur Entfernung der Puffersalze in der Zentrifuge mehrmals mit Wasser, und, um kein verhorntes Material zu erhalten, mit Alkohol und Aceton gewaschen. Rückwiegen nach Trocknen über P_2O_5 .

d) Entchromung:

Hierzu wurde nach einer älteren Vorschrift verfahren⁹⁷⁾ und der Abbaurückstand 24 Stunden mit einigen ml einer 10%igen wässrigen KCN-Lösung geschüttelt. Anschließend intensives Waschen mit destilliertem Wasser, organischen Lösungsmitteln und Trocknen.

e) Quantitative Chrombestimmung im Mikromaßstab:

Für diesen Zweck wurde eine bekannte Vorschrift zum qualitativen Chromnachweis⁹⁸⁾ quantitativ ausgearbeitet. Die angegebene Methode beruht auf einer Farbstoffbildung mit Diphenylcarbazid in schwefelsaurem Medium. Durch Lösen von Chromat in Wasser, Auffüllen auf 10 ml mit 2 n H_2SO_4 und Zugabe von 0,1 ml einer 1%igen Diphenylcarbazid-Lösung fand ich Linearität zwischen der gemessenen Extinktion bei 540 m μ und der Chromat-Konzentration in dem untersuchten Bereich (Abb. 27). Die Methode ist außerordentlich empfindlich.

Für die Analyse der Kollagen-Rückstände wurden ca. 0,5 mg in eine Platinschale eingewogen. Zur Zerstörung der organischen Substanz wird zweimal mit je 1 ml konz. H_2SO_4 abgeraucht und darauf dreimal mit je 2 ml alkalischem H_2O_2 (6%iges H_2O_2 : 0,1 n NaOH = 1 : 1)

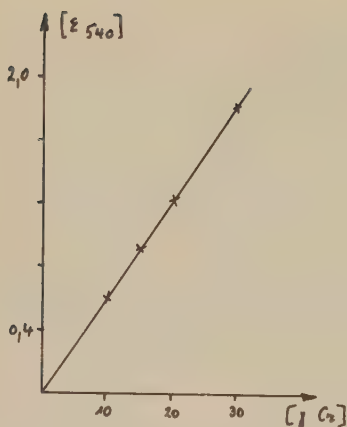


Abb. 27

Diphenylcarbazid-Methode zum
quantitativen Chromnachweis

Eichgerade

Abszisse: Chrom in 10,1 ml

Ordinate: 540 mμ

gemessen im Beckman-Spektralphoto-
meter, Modell B

erhitzt und eingedampft. Darauf behandelt man wie bei der Eichung angegeben. In allen untersuchten Proben lag der Chromgehalt unter 0,1 %.

f) Stickstoffbestimmung nach Kjeldahl:

Überführen des gesamten Stickstoffs in Ammonsulfat durch Aufschluß mit konz. H_2SO_4 in Anwesenheit von Selen-Katalysatoren. Überdestillieren des Ammoniaks, der durch Freisetzen mit NaOH entsteht. Titration mit n/50 HCl.

g) Hexosenbestimmung nach der Anthronmethode⁸¹⁾:

Man wiegt ca. 4 mg Kollagen in ein Reagenzglas ein, versetzt mit 1 ml dest. H_2O und unter Eiswasserkühlung mit 5 ml frisch vorbereitetem Anthronreagens (200 mg Anthron in 100 ml verdünnter Schwefelsäure lösen; Verdünnung der Schwefelsäure 5:2). Unter häufigem Schütteln wird in einem heftig siedenden Wasserbad 10 Min. lang erhitzt. Darauf wird erneut in Eiswasser gekühlt. Nach 30 Min. mißt man bei 625 mμ und 700 mμ gegen eine im Versuch mitgelaufene Blindprobe. Die gesuchte Zuckermenge ist der Differenz der Extinktionen proportional. Zur Berechnung dient Glucose (50 γ/ml).

Versuch 11

Teildenaturierung und anschließender Trypsinabbau von Kollagen

a) Partielle Denaturierung:

1,5 - 2 g Kollagen werden in ca. 100 ml dest. Wasser in einem Becherglas den in Tabelle IX genannten Bedingungen unterworfen. Die Reaktionstemperatur wird durch Thermostaten eingehalten. Während der angegebenen Zeiten wird ständig gerührt. Nach Beendigung kühlt man mit Eiswasser, dekantiert, wäscht mit Alkohol und Aceton und trocknet.

b) Trypsinverdauung:

Das scharf getrocknete und gewogene Kollagen wird mit 50 mg Trypsin (Trypure Novo; Fa. Novo, Kopenhagen) in 50 ml dest. Wasser bei 40° inkubiert. Das pH wird mit n/10 NaOH auf 7,5 - 8,0 eingestellt und in den ersten Stunden der Inkubation öfter nachgeprüft. Nach 48 Stunden wird der Abbau unterbrochen, der verbliebene Rückstand abzentrifugiert, gewaschen und getrocknet. Anschließend werden die Verdauungsversuche 30 Stunden oder länger in gleicher Weise fortgesetzt.

E. Zusammenfassung

1) Die vorliegende Arbeit leistet Beiträge zu einer genaueren Kenntnis der Substratspezifität des Bakterienenzym Kollagenase. Mit Hilfe synthetischer Peptide wurde festgestellt, daß eine von Kollagenase spaltbare synthetische Sequenz



lauten muß. Hierbei bedeuten P Prolin oder Hydroxyprolin, R eine beliebige Aminosäure, X und Y Aminoacylreste oder Schutzgruppen. Die durch Kollagenase angegriffene Peptidbindung ist mit einem Pfeil bezeichnet.

2) Durch partielle Chromgerbung von Kollagen und anschließende Verdauung mit Kollagenase konnte ein Angriff des Enzyms auf neutrale Bereiche der Kollagenfaser gesichert werden.

3) Elektronenmikroskopische Untersuchungen hatten gleiche Ergebnisse.

4) Prokollagen wurde mit Kollagenase enzymatisch aufgespalten. Das entstandene Abbaugemisch wurde durch schrittweisen Edman-Abbau von der Aminoseite her qualitativ und quantitativ untersucht. In Position 1 wurden Glycin, in Position 2 Prolin, in Position 3 wieder Glycin gefunden (Zählung vom Aminoende her); in den ersten zwei Positionen trifft man außerdem kleinere Mengen Alanin, in Position 3 zusätzlich noch Spuren einer ganzen Reihe von Aminosäuren an. Hauptelemente der Primärstruktur des Kollagens sind also in den Neutralbereichen Gly-Pro-Gly und Gly-Pro-Ala neben geringeren Anteilen Gly-Pro-R. In diesen Sequenzen sind 67 % des im Kollagen insgesamt vorhandenen Glycins, 74 % des gesamten Prolins und 42 % des gesamten Alanins festgelegt. Insgesamt wurden durch die vorliegenden Untersuchungen etwa 40 % der gesamten Aminosäuren des Kollagens sequenzmäßig erfaßt.

- 5) Obige Spezifitätsregel der Kollagenase (Punkt 1) gilt also auch für das natürliche Substrat Kollagen. P ist hier aber anscheinend nur Prolin. Das Glycin der spaltbaren Sequenz kann in geringem Maße durch Alanin vertreten sein.
- 6) Weder in zweiter, noch in dritter Position des Abbaugemisches wurde Hydroxyprolin gefunden. Die erhaltenen Ergebnisse sagen also nichts über die Bindungsweise dieser für Kollagen charakteristischen Aminosäure aus. Jedoch machen sie sehr wahrscheinlich, daß Hydroxyprolin wider Erwarten eine vom Prolin verschiedene strukturelle Aufgabe innerhalb der Fibrille hat.
- 7) Durch partiellen enzymatischen Abbau von Haut- und Sehnenkollagen mit Trypsin und Kollagenase wurden die im Kollagen zu etwa 0,5 Gew.% vorkommenden Kohlenhydrate angereichert. Diese Ergebnisse kann man mit einer Beteiligung der Hexosen als strukturverfestigende, quervernetzende Bestandteile der Faser deuten.
- 8) Zur quantitativen Bestimmung der Kollagenase wurden zwei Verfahren entwickelt. Beim ersten wird der durch Enzymeinwirkung in Lösung gehende Teil einer Prokollagensuspension mittels einer Stickstoffbestimmung gemessen. Die zweite Methode benutzt die Ergebnisse über die Enzymspezifität; sie verwendet das Peptid Cbo-Gly-Pro-Gly-Gly-Pro-Ala als Substrat. Man mißt hier die Ninhydrinanfärbung des durch Verdauung mit Kollagenase entstandenen Spaltstücks Gly-Pro-Ala.

F. L i t e r a t u r

- 1) W. Graßmann u. K. Hannig, zitiert in W. Graßmann, Svensk Kem. Tidskr. 72, 275 (1960)
- 2) E. Waldschmidt-Leitz, G. Bretzel u. L. Keller, Naturwiss. 47, 254 (1960)
- 3) J. Banga, Nature 172, 1099 (1953);
J. Banga u. J. Balo, Acta physiol. Hung. 6, 235 (1954)
- 4) W. Kühne, Unters. physiolog. Inst. Heidelberg 1, 210 (1877);
G. Hoppe-Seyler u. K. Lang, Z. physiol. Chem. 215, 193 (1933);
W. Graßmann, Koll. Z. 77, 205 (1936);
W. Graßmann, J. Janicki u. F. Schneider, Stiasny-Festschrift (Ed. Röther-Verlag, Darmstadt 1937)
- 5) A. Rich u. F.H.C. Crick, Nature 176, 915 (1955); s.a.
P.M. Corvan, S. Mac Gavin u. A.C.T. North, Nature 176, 1062 (1955)
- 6) K.H. Gustavson, Acta Chem. Scand. 8, 1298 (1954); Nature 175, 70 (1955)
- 7) T. Nishihara u. P. Doty, Proc. Nat. Acad. Sci. 44, 411 (1958)
- 8) J.T. Randall, J. Soc. Leather Trades' Chem. 38, 362 (1954)
- 9) C.E. Hall, M.A. Jakus u. F.O. Schmitt, J. Amer. Chem. Soc. 64, 1234 (1942)
- 10) C. Wolpers, Klin. Wochenschr. 22, 624 (1943); 23, 169 (1944)
- 11) Th. Nemetschek, W. Graßmann u. U. Hofmann, Z. Naturforschg. 7b, 509 (1952)
- 12) R.S. Baer, Advances Prot. Chem. 7, 69 (1952)
- 13) W. Graßmann, K. Hannig, H. Endres u. A. Riedel, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 306, 123 (1956)
- 14) Habilitationsschrift K. Kühn, Universität Heidelberg 1960
- 15a) K. Kühn, W. Graßmann u. U. Hofmann, Z. Naturforschg. 13b, 154 (1958)
- b) K. Kühn, U. Hofmann, W. Graßmann u. E. Gebhardt, Naturwiss. 45, 521 (1958)
- c) K. Kühn, W. Graßmann u. U. Hofmann, Z. Naturforschg. 14b, 436 (1959)
- d) K. Kühn, U. Hofmann u. W. Graßmann, Naturwiss. 46, 512 (1959)
- e) K. Kühn, U. Hofmann u. W. Graßmann, Naturwiss. 47, 15 (1960)
- f) K. Kühn u. E. Gebhardt, Z. Naturforschg. 15b, 23 (1960)

- 16) J. Groß, H.J.Highberger u. F.O.Schmitt, Proc.Nat.Acad.Sci.
41, 1 (1955)
- 17) J. Nageotte, Compt.Rend.Acad.Sci. (Paris) 184, 115 (1927)
- 18) V.N. Orekhovitsch, A.A. Tustanosky, K.D. Orekhovitsch u. N.J.
Plotnikowa, Biokhimija (UDSSR) 13, 55 (1948)
- 19) W. Graßmann, Leder 6, 241 (1955); vgl. l.c. 1)
- 20) F.O. Schmitt, J. Groß u. J.H. Highberger, Proc.Nat.Acad.Sci.
39, 459 (1953)
- 21) F.O. Schmitt, veröffentlicht von J.H. Highberger in F.O'Flaherty:
Chemistry and Technology of Leather, Vol.I, S.65; New York 1956;
A.J. Hodge u. F.O. Schmitt, Proc.Nat.Acad.Sci. 44, 418 (1958)
- 22) F.O. Schmitt, Proc.Nat.Acad.Sci. 46, 186, 197 (1960)
- 23) K. Kühn, Leder 11, 110 (1960)
- 24a) Dissertation K. Wolf, Universität München 1956
b) W. Graßmann, U. Hofmann, K. Kühn, H. Hörmann H., Endres und
K. Wolf in: R.E. Tunbridge, Connective Tissue, S. 157; Black-
well, Oxford 1957
- 25) W. Graßmann u. H. Schleich, Biochem. Z. 277, 320 (1935)
- 26) W. Graßmann u. E. Zeschitz, Kollagen-Symposium, Weinheim 1957
- 27) M.G. Sevag, Biochem. Z. 273, 419 (1934)
- 28) K. Kühn, U. Hofmann u. W.Graßmann, Z.Naturforschg. 11b, 581 (1956)
- 29) A. Mikhailov, Leder 8, 254 (1957);
s.a. W. Graßmann, Leder 9, 121 (1958)
- 30) Dissertation M. Schleyer, Universität München 1960
- 31) W. Graßmann, K. Hannig u. M. Schleyer, Hoppe-Seyler's Z. physiol.
Chemie 322, 71 (1960)
- 32) H. Hörmann u. G. Fries, Hoppe-Seyler's Z. physiol.Chem.
311, 19 (1958)
- 33) H. Hörmann, K. Hannig u. G. Fries, Hoppe-Seyler's Z. physiol.Chem.
315, 109 (1959)
- 34) S. Sherry, W. Troll u. D. Rosenblum, Proc.Soc.Exptl.Biol.Med.
87, 125 (1954)
- 35) R.P. Hobson, Bioch.J. 25, 1458 (1931);

- F.C.Messer u.R.H.Mc Clellan, J.Lab.Clin.Med. 20, 1219 (1935);
S.E.Ziffren, H.E. Heist, S.C. May u. N.A. Womack, Ann.Surg.
138, 932 (1953);
- D.F. Waterhouse u. H. Irzykiewicz, J.Ins.Physiol. 1, 18 (1957)
- 36) E. Lienert u. W. Thorsell, Exper.Parasitol. 4, 117 (1955)
- 37) R.M. Lewert u. Chang-Ling Lee, J.Infect.Dis. 99, 1 (1956);
J.Trop.Med.Hyg. 6, 473 (1957)
- 38) J.F. Woessner jr. u. T.H. Brewer, Fed.Proc. 19, 335 (1960)
- 39) E. Marchmann, Biochem.Z. 295, 351, 391, 400, (1938);
297, 284 (1938)
- 40) J.D.Mc Lennan, J. Mandl u. E.L. Howes, J.clin.Invest.
32, 1317 (1953)
- 41) R.E. Neuman u.A.A.Tytell, Proc.Soc.Exptl.Biol.Med.73, 409 (1950)
J. Brisou u. J. Milhade, Bull.Soc.Chim.Biol. 33, 64 (1951)
- 42) E. Bidwell u. W.E. von Heyningen, Biochem.J. 42, 140 (1948)
- 43) R. De Bellis, J. Mandl, J.D. Mac Lennan u. E.L. Howes,
Nature 174, 1191 (1954)
- 44) R.B. Stoughton u. A.L. Lorincz, J.Invest.Derm. 16, 43 (1951)
- 45) J. Mandl, J.D.Mac Lennan u. E.L. Howes, J.Clin.Invest.
32, 1323 (1953);
P.H. Springell, Proc.Int.Wool Text.Res.Conf.Austr., Vol. C,
p.C 217 (1955)
- 46) J. Mandl, H. Zipper u. L.T. Ferguson, Arch.Biochem.Biophys.
74, 465 (1955)
- 47) P.M. Gallop, S. Seifter u. E.Meilman, J.Biol.Chem.227,891 (1957)
- 48) S. Seifter, P.M. Gallop, Le Roy Klein u. E. Meilman, J.Biol.
Chem. 234, 285 (1959)
- 49) O.H.Lowry, N.J. Rosebrough, A.D. Farr u. R.J. Randall,
J.Biol.Chem. 193, 265 (1951)
- 50) R.E. Neumann, Arch.Bioch. 24, 289 (1949);
To-jo-o-Takahushi u. Wakichi, Bull.Jap.Soc.Scient.Fisheries
20, 525 (1954)
- 51) S.C.Chou u.A. Goldstein, Biochem.J. 75, 109 (1960)
- 52) R.A. Cleghorn u. L. Jendrassik, Biochem.Z. 274, 189 (1934);
W. Graßmann, R. Strobel, K. Hannig u. M. Deffner-Plöckl,
Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 305, 21 (1956)

- 53) W. Graßmann, H. Hörmann, A. Nordwig u. E. Wunsch, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 316, 287 (1959)
- 54) S. Ruhemann, J.Chem.Soc. 97, 1438, 2025 (1910)
99, 792, 1486 (1911)
- 55) S. Moore u. W.H. Stein, J.Biol.Chem. 176, 367 (1948);
J. Biol.Chem. 211, 907 (1954)
- 56) E. Wunsch, in Vorbereitung
- 57) W. Graßmann und A. Nordwig, Hoppe-Seyler's Z. physiol.Chem. 322, 267 (1960)
- 58) J.C. Harris und C.H. Li, J.Am.Chem.Soc. 74, 2944 (1952);
vgl. zu dieser Frage die Literaturzusammenstellung bei
A. Riedel, Dissertation Universität München, 1956
- 59) R. Monier, G. Litwack, M. Somlo u. B. Labouesse, Biochim. Biophys.Acta 18, 71 (1955)
- 60) S. Michaels, F.M. Gallop, S. Seifter u. E. Meilman, Biochim. Biophys. Acta 29, 450 (1958)
- 61) W. Harrington u. F.H. v.Hippel, Zitiert in l.c. 48)
- 62) Y. Nagai u. H. Noda, Biochim.Biophys.Acta 34, 298 (1959)
- 63) K. Heyns u. G. Legler, Hoppe-Seyler's Z. physiol.Chem. 315, 288 (1959)
- 64) F. Reindl u. W. Hoppe, Chem. Ber. 87, 1103 (1954)
- 65) J. Mandl, priv. Mitteilung; vgl. l.c. 74)
- 66) F. Sanger, Biochem.J. 39, 507 (1945)
- 67) R.R. Porter u. F. Sanger, Biochem. J. 42, 287 (1948)
- 68) C.H.W.Hirs, S. Moore u. W.H. Stein, J.Biol.Chem. 235, 633 (1960)
- 69) F.A. Anderer, H. Uhlig, E. Weiger u.G. Schramm, Nature 186, 922 (1960)
- 70) P. Edman, Acta Chem.Scand. 4, 277, 283 (1950);
B. Blombäck u. J. Yamashina, Arkiv f. Kemi 12, 299 (1958)
- 71) S. Eriksson u. J. Sjöquist, Biochem.Biophys.Acta 45, 290 (1960)
- 72) K. Hannig, Clin.Chim.Acta 4, 51 (1959)
- 73) J.R.Shelton u. W.A.Schroeder, J.Amer.Chem.Soc. 82, 3342 (1960);
G.Braunitzer, unveröffentlicht; K.Hannig, mündl.Mitteilung

- 74) Y. Nagai, S. Sakakibara, H. Noda u. S. Akabori, Biochim.Biophys.Acta 37, 567 (1960)
- 75) W.A. Schroeder, L. Honnen u. F.C. Green, Proc.Nat.Acad.Sci. 39, 23 (1953);
W.A.Schroeder, L.M. Kay, J. Le Gette, L. Honnen u. F.C. Green, J.Amer.Chem.Soc. 76, 3556 (1954)
- 76) T.D. Kroner, W. Tabroff u. J.J. Mc Garr, J.Amer.Chem.Soc. 75, 4084 (1953);
77, 3356 (1955)
- 77) R.E. Schrohenloher, J.D. Ogle u. M.A. Logan, J.Biol.Chem. 234, 58 (1959)
- 78) W. Graßmann, K. Hannig, P. Pollak u. A. Nordwig, Hoppe-Seyler's Z. physiol.Chem., in Vorbereitung
- 79) K.H. Gustavsson, The Chemistry and Reactivity of Collagen; Acad.Press Inc., New York 1956, p. 271 ff.
- 80) H.Hörmann, Leder 11, 173 (1960)
- 81) W.E. Yemm und A.J. Willis, Biochem. J. 57, 508 (1954)
- 82) Dissertation M.Klenk, Universität München 1960;
H. Hörmann u. M. Klenk, noch unveröffentlicht
- 83) W. Graßmann, Koll.Z. 77, 205 (1936)
- 84) W. Graßmann, L. Klenk und T. Peters-Mayr, Biochem.Z. 280, 307 (1935)
- 85) M. Bergmann u. C. Niemann, J.Biol.Chem. 115, 77 (1936)
- 86) M. Bergmann u. C. Niemann, Ann.Rev.Biochem. 7, 110 (1938);
J.Biol.Chem. 118, 307 (1937); Science 86, 187 (1937)
- 87) W. Graßmann, Grundfragen aus der Silikoseforschung (1. Sonderbd. der Beiträge zur Silikoseforschung, Bochum 1956), S. 137 ff.
- 88) Dissertation L. Grimm, Universität München 1961
- 89) F. Schneider, Vortrag Tagung Physiol. Chemie, Frankfurt/Main 1948
d.a. Angew. Chemie 61, 259 (1949)
- 90) H. Hörmann, Beiträge zur Silikoseforschung, Sonderband 2, 1957
S. 619
Dissertation T. Fujii, Techn.Hochschule Darmstadt 1961
- 91) K.H. Gustavson, J.Am.Leather Chem.Assoc. 50, 239 (1955)
- 92) W. Graßmann, H.Hörmann u. H.Endres, Chem.Ber. 88, 102 (1955)

- 93) Diplomarbeit A. Müller, München 1958
- 94) W. Graßmann, H. Hörmann u. R. Hafter, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 307, 87 (1957)
- 95) J. Banga, Acta Physiol. Acad. Sci. Hung. 3, 317 (1952)
- 96) H.F. Schott, J.B. Larkin, L.B. Rockland u. M.S. Dunn, J. org. Chem. 12, 490 (1947)
- 97) D.R.P. 582 919 vom 19.8.31; ref. in Coll. (Darmstadt) 1933, 731
- 98) F. Feigl, Spot Tests in Inorganic Chemistry, Elsevier Publish. Comp., 5. Aufl. 1958, p. 167
- 99) K. Heyns u. G. Legler, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 321, 184 (1960)
- 100) E.L. Smith u. W.J. Polglase, J. Biol. Chem. 180, 1209 (1949)
R.L. Mill u. E.L. Smith, J. Biol. Chem. 224, 209 (1957)
- 101) W. Graßmann, A. Nordwig u. H. Hörmann, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. (im Druck)
- 102) K. Kühn u. A. Nordwig, ebenda (in Vorbereitung)
- 103) H. Hörmann u. A. Nordwig, ebenda (in Vorbereitung)
- 104) K. Kühn, U. Hofmann u. W. Graßmann, Z. Naturforschg. 11b, 581 (1956)

L e b e n s l a u f

Am 28. Juli 1931 wurde ich als viertes Kind des Buchhalters Stanislaus Nordwig und seiner Ehefrau Rosel, geb. Mathea, in Krappitz, Kreis Oppeln / Oberschlesien geboren.

Dort besuchte ich die Volksschule und ab 1941 bis zu unserer Vertreibung aus der Heimat im Januar 1945 die Städt. Mittelschule. Im Juli 1951 legte ich an der Oberrealschule in Amberg / Oberpfalz die Reifeprüfung ab. Seit dem Wintersemester 1952/53 studiere ich Chemie an der Universität München, wo ich im Februar 1955 die Diplomchemiker-Vorprüfung und im November 1956 das Hauptexamen bestand. Meine Diplomarbeit "Versuche zur quantitativen Abstufung der Reduktionskraft von Doppelhydriden des Typs LiXH_4 " fertigte ich anschließend im Anorganisch-Chemischen Institut bei Priv.Doiz.Dr.M. Schmidt an.

Seit Oktober 1957 arbeitete ich, durch längere Krankheit unterbrochen, als Hilfsassistent an der vorliegenden Dissertation am Max-Planck-Institut für Eiweiß- und Lederforschung.

